

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Éc	ole	doctorale		
Sc	ien	ces de la vie		
		et de la san t	t é ED 4	114
Université de Strasbourg				

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ CNRS UPR 3212 – Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives



Marie-Azélie MORALIA

soutenue le : 13 juin 2023

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au Bisphénol A au cours du cycle biologique d'un rongeur saisonnier (*Phodopus sungorus*)

THÈSE dirigée par : Dr. Valérie SIMONNEAUX Strasbourg

Directrice de recherche, INCI, CNRS UPR 3212, Université de

RAPPORTEURS :

Pr. Anne-Simone PARENT Liège, Belgique Dr. Hugues DARDENTE Professeure-Praticienne hospitalier, GIGA-Neurosciences,

Directeur de recherche, INRAE UMR PRC Nouzilly

AUTRES MEMBRES DU JURY : Dr. Sakina MHAOUTY-KODJA Dr. Jorge MENDOZA Strasbourg

Directrice de recherche, IPBS, CNRS UMR 8246, Paris Directeur de recherche, INCI, CNRS UPR 3212, Université de

« If we are going to live so intimately with these chemicals – eating and drinking them, taking them into the very marrow of our bones – we had better know something about their nature and their power. »

– Rachel Carson, Silent Spring (1962)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, Pr Anne-Simone Parent, Dr Hugues Dardente, Dr Sakina Mhaouty-Kodja et Dr Jorge Mendoza d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, ainsi que les membres de mon comité de suivi de thèse de m'avoir conseillé tout au long de ce projet.

Je souhaite bien évidemment remercier ma directrice de thèse. Merci Valérie pour tout ce que cette expérience de recherche à vos côtés m'a apporté. Merci de m'avoir fait confiance sur ce tout nouveau projet « perturbateurs endocriniens », qui n'a pas eu des débuts très faciles ! J'ai énormément apprécié travailler à vos côtés tout au long de ces 4 années de thèse, vous avez toujours été disponible, pédagogue et bienveillante tout en me laissant la possibilité de proposer des idées. Votre engagement et votre motivation scientifique ont vraiment été très inspirants pour moi. Merci pour toutes ces heures de relecture (et les safaris en Afrique) !

Je tiens également à remercier Béatrice pour toute ton aide sur ce projet et pour ton investissement dans les manips avec les animaux et dernièrement les préparations histologiques. Ton soutien m'a été indispensable (surtout pendant les longues semaines où il fallait préparer des kilos de croquettes au BPA !) et tes conseils m'ont toujours énormément aidé ! Merci pour tes bons petits plats, les bouquets de lavande et ta bonne humeur sans faille ! Ça a été un véritable plaisir de travailler à tes côtés.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels de l'animalerie sans qui ce travail sur les hamsters n'aurait pas été possible. Dominique, ta supervision dans la gestion des hamsters (qui n'a pas toujours été simple) et des pièces à l'animalerie a été indispensable, merci pour ton investissement, ta bienveillance et ta réactivité à toutes épreuves. Merci aussi d'avoir bien voulu m'accompagner dans les manips de calorimétrie, ton investissement scientifique et technique est réellement inspirant. Merci à Nicolas pour ton aide avec les sibériens et ta bonne humeur quotidienne à l'animalerie. Merci à Sophie, Bruno, Olivier et Antoine pour votre disponibilité également.

Je tiens à remercier Yannick Goumon et Virginie Andry pour les dosages par spectrométrie de masse. Ça a été très enrichissant pour moi de découvrir cette technique, merci d'avoir pu me laisser l'opportunité de suivre et de participer aux manips.

Je tiens à remercier tous les membres de la nouvelle équipe Régulation et perturbations des rythmes neuroendocriniens : merci à Paul, votre expertise dans les rythmes biologiques et les techniques histologiques a toujours été très enrichissante pour moi. Je tiens également à remercier VJ, Etienne, Patrick, Sylvie, Hervé, Illona, Stéphanie, notamment pour vos conseils en réunion d'équipe et pour votre bonne humeur.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres de l'étage NBR : Jorge, Marie-Paule, Cristina, Virginie, Amandine car il a toujours été très agréable pour moi de venir travailler à vos côtés.

Merci à Marie-Pierre pour ta bienveillance.

Enfin, je souhaiterai remercier mes collègues et amis. Merci à Marine et Louise, je crois qu'on s'est plutôt bien trouvé toutes les 3, je n'aurais pas pu espérer meilleurs collègues boulettes ! Merci pour votre soutien, nos fous rires et tous ces moments qui rendent le quotidien au bureau exceptionnel. Merci également à Aurélia pour ta bonne humeur aux pauses repas ! Je remercie aussi les « anciens » de l'équipe/étage et tout particulièrement Clarisse de m'avoir accueillie et formée au début de ma thèse. Merci aussi à Guillaume pour ton support infaillible, Nadia, Bastien, Fernando, Eleni, Mathilda, Vebjorn, Fredrik, Rosanna. Et à tous les étudiants actuels de l'étage NBR : Noëmi, Fabiana, Emma, Axelle, Hugo et Clément, je vous souhaite un bon courage pour votre suite de thèse !

Merci à l'ensemble des doctorants de l'INCI et notamment Théo G, Théo R, Angel, Etienne, (pas) Valod, Marion, Camille, Louise, Sarah, Valentin, Karim...

Je n'oublie pas les bichons, Aurore, Julia, Lucas, Cyralex et tous les copains du master.

Un merci tout particulier à Flo. Sans ton soutien indéfectible depuis toutes ces années, je n'aurais très probablement par tenu le rythme soutenu de cette aventure !

Enfin, je voudrais remercier tous mes amis du Sud et ma super famille pour votre soutien ces dernières années malgré la distance physique, sans oublier Diego. J'espère que le résumé de ma thèse vous permettra de comprendre un petit mieux pourquoi je coupais des tranches de cerveau et je palpais des testicules de hamsters sur mes heures de travail.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	
Liste des tableaux	9
Liste des figures	
Liste des annexes	
Abréviations	
Introduction	
Chapitre 1 : Les rythmes saisonniers	
I) I as animally adaptant laur biologia any saisans	20

I) Les animaux adaptent leur biologie aux saisons
1. Le phénomène de la rythmicité saisonnière
a. Les mouvements de la Terre à l'origine des saisons
b. Définition des rythmes saisonniers
2. Réponses biologiques aux saisons
a. Reproduction
b. Métabolisme énergétique
c. Pelage
d. Des adaptations physiologiques chez l'humain
3. Indicateurs saisonniers
a. Photopériode
b. Flexibilité des réponses photopériodiques27
c. Cas particulier de rythmes endogènes
II) Mécanismes photoneuroendocriniens de l'intégration du message photopériodique 29
1. L'axe rétino-hypothalamo-pinéal
a. La rétine transduit le message photique en influx nerveux
b. Les noyaux suprachiasmatiques mesurent la longueur du jour
c. La mélatonine est l'hormone des saisons
d. Les cibles mélatoninergiques impliquées dans la transmission du message saisonnier 34
2. La pars tuberalis : une structure endocrine clef dans l'intégration de la photopériode 35
a. L'expression de la TSHβ par la pars tuberalis est régulée par les modifications photopériodiques de la mélatonine
b. Régulation photopériodique de la prolactine
3. Rôle des hormones thyroïdiennes dans le contrôle central des fonctions saisonnières 38
a. Rôle des hormones thyroïdiennes dans les fonctions saisonnières

b d	. Voie rétrograde : la TSH sécrétée par la pars tuberalis régit le métabolisme de la T3 ans l'hypothalamus médiobasal	39
4.	Régulations neuroendocriniennes de la physiologie saisonnière	42
a	La régulation saisonnière de l'axe gonadotrope	42
	i. L'axe gonadotrope	42
	ii. Saisonnalité de l'axe gonadotrope	44
	iii. Régulation saisonnière de l'activité des neurones à GnRH	44
b	. Les régulateurs saisonniers du métabolisme énergétique	53
	i. Métabolisme du tissu adipeux blanc	53
	ii. Prise alimentaire	54
	iii. Dépense énergétique et tissu adipeux brun	57
	iv. Cycles de croissance	57
	v. Les tanycytes : médiateurs de l'homéostasie énergétique	58
c é	. Synchronisation neuroendocrine de la saisonnalité reproduction et du métabolisme nergétique	59
5.	Le hamster djungarien pour modéliser en laboratoire les rythmes saisonniers de la	
repi	oduction et du métabolisme énergétique	62
6.	Les rythmes saisonniers : quelles sont les perspectives de recherche ?	62
Chapitr	e 2 : Les perturbateurs endocriniens	64
I. (Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?	65
1.	Définition	65
2.	Sources d'exposition	65
3.	Mécanismes d'action	67
4.	Les caractéristiques des PE	68
а	. Effets à faibles doses et non-monotones	69
b	. Effets des mélanges de PE	71
c	. Fenêtres critiques de sensibilité et effets à long-terme	72
5.	Les conséquences sur la santé	73
II.	Zoom sur le bisphénol A	74
1.	Origine et usage	74
2.	Exposition au BPA	75
a	. Exposition environnementale	75
b	. Exposition humaine	76
c	. Biodisponibilité	77
3.	Mécanismes d'action	78
а	. Action directe sur les récepteurs hormonaux	78
b	. Modulation indirecte de l'activité hormonale	79
c	. Régulation épigénétique	80

4.	Effets sur la reproduction et le métabolisme énergétique	81
а	. Effets sur la fonction de reproduction	81
b	. Effets neuroendocriniens sur l'axe gonadotrope	87
с	Effets sur le métabolisme énergétique	88
III.	Les perturbateurs endocriniens et les rythmes biologiques	90
1.	L'horloge circadienne est une cible des PE	90
2.	Des perturbateurs endocriniens saisonniers ?	91

Projet 1 changen	: Evaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA au cours de nents photopériodiques chez le hamster djungarien	96
Matér	riel et méthodes	97
1.	Animaux	98
2.	Préparation de la nourriture pour l'exposition au BPA par voie alimentaire	98
3.	Protocoles expérimentaux	. 100
a 1'	. Expérience 1 : évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA pene intégration d'une photopériode courte	dant . 100
b 1'	Expérience 2 : évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA pene intégration d'une photopériode longue	dant . 100
c	. Critères d'exclusion	. 101
4.	Suivis et analyses longitudinales	. 103
a	. Poids corporel	. 103
b	Prise alimentaire	. 104
c	. Pelage	. 104
5.	Mise à mort et prélèvements des tissus	. 107
6.	Déshydratation et stockage des tissus prélevés	. 107
7.	Préparation des cerveaux : enrobage, coupe, montage sur lames	. 108
a	. Enrobage	. 108
b	Coupes des cerveaux au microtome	. 108
с	. Montage des coupes sur lame	. 108
8.	Hybridation in situ non-radioactive	. 109
a	. Principe	. 109
b	Synthèse des ribosondes marquées aux haptènes	. 109
с	. Hybridation in situ : protocole standard	. 110
d	Double marquage par hybridation in situ	. 113
9.	Immunohistochimie	. 114
a	. Principe	. 114
b	Réactivation antigénique et blocage des sites non spécifiques	. 115
с	. Incubation des anticorps et amplification du signal	. 115

d.	Révélation par détection de l'activité enzymatique116
10.	Acquisition et analyse des images
11.	Dosages plasmatiques
a.	Dosages du BPA-glucuronide et de la testostérone par LC/MS-MS118
b	Dosages de l'insuline et de l'œstradiol par ELISA119
12.	Analyses statistiques
Résult	ats
1.	Le BPA-glucuronide est détecté dans le plasma des hamsters exposés au BPA 122
2. neur	Évaluation de l'intégration de la photopériode courte sur divers paramètres physiologiques et roendocrinologiques d'hamsters femelles et mâles exposés oralement au BPA
3. et ne	Évaluation de l'intégration de la photopériode longue sur divers paramètres physiologiques euroendocriniens d'hamsters femelles et mâles exposés oralement au BPA
Discus	sion
1. L	'exposition au BPA a des effets mineurs sur l'intégration du message photopériodique 141
2. L	e BPA perturbe la cinétique des réponses physiologiques aux changements photopériodiques
a.	Effet du BPA sur la régulation photopériodique du métabolisme énergétique142
b	Effet du BPA sur la régulation photopérioque de la reproduction143
c.	Effet du BPA sur la régulation photopérioque de la reproduction144
3. L	es effets du BPA sur l'intégration photopériodique varient en fonction du sexe144
4. L	es effets du BPA sur l'intégration photopériodique varient en fonction de la dose 146
5. C	onclusion, limites et perspectives sur l'effet du BPA sur l'intégration photopériodique 146

Projet 2 : Evaluation des effets somato-endocriniens d'une exposition au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle au cours du cycle biologique du hamster djungarien... 148

Matér	riel et méthodes	. 149
1.	Animaux	. 150
2.	Protocole expérimental	. 150
3.	Exposition orale au BPA des femelles lors de l'accouplement, la gestation et la lactation	151
4.	Suivis longitudinaux	. 154
a	. Suivi de la gestation et des naissances	. 154
b	Suivi du comportement maternel	. 154
5.	Suivi du développement métabolique et reproducteur des petits	. 156
a	. Croissance et prise alimentaire	. 156
b	9. Puberté	. 157
c	Calorimétrie indirecte	. 157
6. repi	Suivi du poids corporel, de la prise alimentaire, du changement de pelage et de l'activité roductrice au cours du transfert en photopériode courte	. 158

7.	Mise à mort et prélèvement des tissus des petits exposés au BPA ou au véhicule	159
8.	Histologie des ovaires	159
a	. Préparation des ovaires : enrobage, coupe, montage sur lames	160
b	Coloration à l'hématoxyline et l'éosine	160
c	. Comptages des follicules ovariens	162
9.	Analyses statistiques	163
Résul	tats	164
1.	Vérification de l'exposition au BPA chez les mères	165
2.	Effet de l'exposition au BPA sur la fertilité	165
3.	Effet de l'exposition au BPA sur le comportement maternel	165
4. che	Evaluation des effets somato-endocriniens à long-terme d'une exposition maternelle au z le hamster djungarien femelle	BPA 168
a	. Puberté et croissance	168
b	Métabolisme énergétique et système reproducteur à l'âge adulte	168
с	. Intégration du changement photopériodique à l'âge adulte	169
5. che	Evaluation des effets somato-endocriniens à long-terme d'une exposition maternelle au z le hamster djungarien mâle	BPA 170
a	. Croissance et puberté	170
b	. Système reproducteur à l'âge adulte	171
c	. Intégration du changement de photopériode à l'âge adulte	171
Discu	ssion	180
1. L fem	c'exposition périnatale au BPA perturbe la fertilité et le comportement maternel des hams nelles	sters 181
2. L dese	c'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation induit des effets obésogènes chez cendance	la 182
3. E dese	Effet de l'exposition périnatale au BPA sur la puberté et le système reproducteur de la cendance	184
4. L	les effets du BPA sur l'intégration photopériodique de la descendance dépendent du sexe	185
5. F	Perspectives générales	186
Discu	ssion générale	187
1. F	Forces, limites et difficultés de la modélisation de l'exposition aux PE	188
a	Voia d'avposition	
		188
b	 Vole d'exposition Fenêtre et durée d'exposition 	188 188
b c	 vole d'exposition Fenêtre et durée d'exposition Modélisation de l'exposition d'un seul PE sur (au moins) 1000 	188 188 189
b c 2. Q	 voie d'exposition Fenêtre et durée d'exposition Modélisation de l'exposition d'un seul PE sur (au moins) 1000 Quels impacts écologiques ? 	188 188 189 189
b c 2. (a	 voie d'exposition Fenêtre et durée d'exposition Modélisation de l'exposition d'un seul PE sur (au moins) 1000 Quels impacts écologiques ? Surfertilité 	188 188 189 189 189 189

с.	Conclusion générale	
Bibliogr	aphie	
Annexes.		

Liste des tableaux

Tableau 1: Effets du BPA sur la reproduction.
 86

 Tableau 2 : Hamsters catégorisés comme photo non-répondants et exclus des analyses des expériences **Tableau 3**: Les six stades de changement saisonnier du pelage du hamster Djungarien...... 106

 Tableau 4 : Ribosondes utilisées pour l'hybridation in situ.
 110

 Tableau 5 : Fonctions des solutions utilisées dans les étapes d'une hybridation in situ. 112
 Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunohistochimies.
 115
 Tableau 7 : Poids relatif de l'utérus et des ovaires, concentrations plasmatiques d'œstradiol et rapport glucose/insuline de hamsters djungariens femelles exposées oralement au véhicule (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) µg de BPA/kg/jour pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou maintenues en photopériode longue (PL + veh)...... 126 **Tableau 8**: Poids relatif des testicules et des vésicules séminales, concentrations plasmatiques de testostérone et rapport glucose/insuline de hamsters djungariens mâles exposés oralement au contrôle (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) µg de BPA/kg/jour pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou maintenus en photopériode longue (PL + veh). 129 Tableau 9 : Poids relatif de l'utérus et des ovaires, concentrations plasmatiques d'œstradiol et glycémie de hamsters djungariens femelles exposées au véhicule (swPL + véhicule), 5 (swPL + BPA 5) ou 500 µg/kg/jour de BPA (swPL + BPA 500) pendant 10 semaines de transfert en photopériode longue, ou **Tableau 10**: Poids relatif des testicules et des vésicules séminales, concentrations plasmatiques de testostérone et glycémie de hamsters djungariens mâles exposés au véhicule (swPL + veh), 5 (swPL + BPA 5) ou 500 (swPL + BPA 500) µg/kg/jour de BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode Tableau 11 : Comportements maternels observés par la méthode d'échantillonnage par balayage **Tableau 12**: Préparations et compositions des solutions utilisées pour la coloration HE. 161 **Tableau 13**: Effet de l'exposition au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle sur les naissances, la mortalité post-natale, la taille et le sexe-ratio des portées de hamsters djungariens..... 166 Tableau 14 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur l'apparition de la puberté des femelles (âge à l'ouverture vaginale) et des mâles (âge à la séparation balano-préputiale et Tableau 15 : Effet de l'exposition maternelle au BPA sur des paramètres métaboliques mesurés par calorimétrie indirecte, l'activité ambulatoire et la prise alimentaire des hamsters djungariens femelles, Tableau 16 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur des paramètres somatiques et endocrines du système reproducteur de hamsters djungariens mâles et femelles transférés

Liste des figures

Figure 1 : Position de la Terre sur son orbite autour du Soleil	20
Figure 2 : Les reproducteurs de jours longs et de jours courts	22
Figure 3 : Variation photopériodique du poids corporel de hamsters djungariens	23
Figure 4 : Les variations saisonnières du plumage ou du pelage	24
Figure 5 : Variation annuelle de la photopériode à Strasbourg en 2022	26
Figure 6 : Concept du système de mesure du temps photopériode	27
Figure 7 : Boucle de rétrocontrôle moléculaire des noyaux suprachiasmatiques	30
Figure 8 : La photopériode module l'expression rythmique d'horloge circadienne des NSC	31
Figure 9 : Schéma de l'axe rétino-hypothalamo-pinéal et de la synthèse de la mélatonine p	par les
pinéalocytes	33
Figure 10 : Autoradiographie localisant la présence du récepteur MT1	34
Figure 11 : Schéma d'une section sagittale situant la pars tuberalis au sein du complexe hypotha	alamo-
hypophysaire et le système sanguin porte	35
Figure 12 : Micrographies de marquages à l' α GSU et la TSH β dans la pars tuberalis de ha	msters
d'Europe hébergés en photopériode longue (LP) et en photopériode courte (SP)	36
Figure 13 : Modèle de la régulation photopériodique de l'expression de la TSHβ	37
Figure 14 : L'administration centrale de T3 empêche la régression testiculaire et la perte de	poids
corporel induite par la photopériode courte (PC)	39
Figure 15 : Le métabolisme des hormones thyroïdiennes par les déiodinases 2 et 3 (Dio2 et Dio3	3)40
Figure 16 : L'administration centrale de TSH augmente l'expression de Dio2 chez des ha	msters
djungariens exposés à une photopériode courte	41
Figure 17 : Schéma récapitulatif de la voie TSH/déiodinases/hormones thyroïdiennes intégr	rant le
message photopériodique chez les mammifères et les oiseaux	41
Figure 18 : L'axe gonadrotrope	43
Figure 19 : Le rôle des tanycytes	46
Figure 20 : Expériences de Revel <i>et al.</i> , en 2006	49
Figure 21 : Variations photopériodiques de RFRP-3 dans l'hypothalamus de reproducteurs de	; jours
longs et de jours courts (Angelopoulou et al., 2019)	51
Figure 22 : Schéma simplifié du contrôle hypothalamique de la prise alimentaire	55
Figure 23 : Schéma conceptuel proposant les tanycytes comme des éléments intégrateurs cle	fs des
signaux nutritionnels et métaboliques.	59
Figure 24 : Schéma simplifié du contrôle photopériodique de la reproduction et du métab	olisme
énergétique	61
Figure 25 : Les sources de PE.	66
Figure 26 : Schéma des principaux mécanismes d'action des PE sur le système endocrinien	68
Figure 27 : Exemples de courbes dose-réponse (A) linéaires, (B) non-linéaires monotones et (C) non-
monotones.	70
Figure 28 : Concept des effets cumulatifs et synergiques des mélanges de substances.	71
Figure 29 : Structure du BPA.	74
Figure 30 : Illustration des sources d'exposition au BPA pour les humains, les animaux d'elevage	et les
animaux sauvages.	76
Figure 31 : Protocoles experimentaux.	101
Figure 32 : Exemples d'analyses realisees.	104
Figure 55 : Les variations saisonnieres de pelage du hamster djungarien.	105 DN
rigure 34 : Representation schematique des detections immuno-enzymatiques des hybrides A	KINM.
Eigen 25 - Concentration placementions on DDA alternation of the table of the second s	114
rigure 55. Concentration plasmatique en BPA-glucuronide, et effet de l'exposition au BPA	sur la
cinerque de perte de poids corporei, le ratio d'efficacite alimentaire et les variations du pela	ige de
namsters ujungariens rememes mansferees pendant 10 semaines en PC	123

Figure 36 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la pars tuberalis, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens femelles après 10 semaines en photopériode courte pendant lesquelles elles ont été exposées oralement à différentes doses de BPA.-----127 Figure 37 : Concentration plasmatique en BPA-glucuronide, et effet de l'exposition au BPA sur la cinétique de perte de poids corporel, le ratio d'efficacité alimentaire et les variations du pelage de hamsters djungariens mâles transférés pendant 10 semaines en PC. ------ 128 Figure 38 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la pars tuberalis, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens mâles après 10 semaines en photopériode courte pendant lesquelles ils ont été exposés oralement à différentes doses de BPA. ----- 130 Figure 39: Concentration plasmatique de BPA-glucuronide, poids corporel, ratio d'efficacité alimentaire et variation du pelage des hamsters djungariens femelles exposées au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue.-----134 **Figure 40** : Expression en ARNm ou protéine de TSH^β dans la pars tuberalis, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens femelles exposées au BPA pendant 10 semaines de transfert en photopériode longue (swPL), ou maintenues constamment en photopériode longue (PL). ------136 Figure 41: Concentration plasmatique de BPA-glucuronide, poids corporel, ratio d'efficacité alimentaire et variation du pelage des hamsters djungariens mâles exposés au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue. -----137 Figure 42 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la pars tuberalis, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens mâles exposés au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue.-----139 Figure 43 : Analyse en composantes principales des paramètres neuroendocriniens et physiologiques évalués en PC (A) et swPL (B) chez les hamsters djungariens mâles et femelles contrôles. -----145 Figure 44 : Protocole expérimental évaluant les impacts de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur la fertilité et le comportement maternel, la croissance et la puberté des petits et leur capacité à l'âge adulte à adapter leur physiologie à un transfert en photopériode courte.-----151 Figure 45 : Illustration schématique de la préparation des morceaux de gelées contenant du BPA ou l'éthanol distribués aux femelles hamsters lors de l'accouplement, la gestation et la lactation. ----- 153 Figure 46 : Illustration d'une feuille d'observation complétée lors d'une session de 1 h d'observation de comportement maternel par la méthode d'échantillonnage par balayage, d'après Franks et al., 2011. -----156 Figure 47 : Illustration des rubans paraffinés de coupes d'ovaire montés sur lame. ------ 160 Figure 48 : Stades de maturation et d'atrésie des follicules ovariens. (A) Follicule primordial, (B) follicule primaire, (C) follicule secondaire, (D) follicule antral, (E) corpus luteum, (F) follicule atrétique avancé, (G) follicule atrétique terminale. Barre d'échelle (trait blanc) = 50 µm. ----- 162 Figure 49 : Concentrations plasmatiques en BPA-glucuronide des mères exposées au véhicule ou à 5 µg/kg/jour de BPA par une administration orale quotidienne pendant l'accouplement, la gestation et la lactation. ------ 166 Figure 50 : Effets de l'exposition au BPA sur les comportements de soin des petits (allaitement, toilettage, contact, construction du nid) et non dirigés vers les petits (auto-toilettage, prise alimentaire et hydrique, absence de contact envers les petits) aux jours lactationnels 2, 4, 7 et 14. ----- 167 Figure 51 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur le poids corporel et la prise alimentaire des petits après le sevrage. -----172 Figure 52 : Représentation des données et de l'analyse de la dépense énergétique des hamsters femelles exposées maternellement au BPA par calorimétrie indirecte. La dépense énergétique a été évaluée pendant 68 h en mesurant les échanges gazeux des hamsters en temps réel dans des cages métaboliques. -----173

Liste des annexes

Annexe 1 : Détection des neurones marqués au Rfrp avec QuPath	229
Annexe 2 : Détection des neurones marqués à la Kisspeptine avec StarDist/QuPath (script)	230
Annexe 3 : Conditions utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	en
tandem	232
Annexe 4 : Estimation du volume testiculaire (EVT)	235
Annexe 5 : Analyses en Composantes Principales avec R (script)	236
Annexe 6 : Environmental disruption of reproductive rhythms.	238

Abréviations

- α -GSU = sous-unité glycoprotéique α α -MSH = hormone mélanotrope AA-NAT = arylalkylamine N-acétyl transférase aCSF = liquide cérébrospinal artificiel AgRP = agouti-related protein AKT = protéine kinase B AMPc = adénosine monophosphate cyclique AP = tampon Tris salin 1X à pH 9,5AR = récepteur nucléaire des androgènes ARC = noyau arqué ARE = éléments de réponse aux androgènes AS = anti-sensATP = adénosine-triphosphate AVP = vasopressineAVPV = noyau périventriculaire antéroventral BCIP = bromo-chloro-indolyl phosphate BPA = bisphénol A CART = transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine CpG = cytosine-phosphate-guanine Cyp11A1 = enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol DAB = diaminobenzidine DDT = dichloro-diphényl-trichloroéthane DEHP = bis(2-ethylhexyl) phtalate DEPC = diéthyl pyrocarbonate DES = diéthylsilbestrol DIG = digoxigénine Dio2 = déiodinase 2Dio3 = déiodinase 3DJT = dose journalière tolérable DMH = hypothalamus dorsomédial
- DMN = noyau dorsomédian
- DOHaD = origines développementales de la santé et de la maladie

- $EER\gamma = récepteur gamma lié aux œstrogènes$
- EFSA = Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
- EM = éminence médiane
- ER = récepteur aux œstrogènes
- ERE = éléments de réponse aux œstrogènes
- ERK1/2 = kinases impliquées dans la régulation des signaux extracellulaires
- EVT = estimation du volume testiculaire
- EYA3 = eyes absent 3
- FAO = Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation
- FDA = Food and Drug Administration
- FLUO = fluorescéine
- FSH = hormone folliculo-stimulante
- G/I = rapport glucose/insuline
- $GABA = acide \gamma$ -aminobutyrique
- GH = hormone de croissance
- GnIH = Gonadotropin-Inhibitory Hormone
- GnRH = gonadolibérine (Gonadotropin-Releasing Hormone)
- GPR = récepteur couplé aux protéines G
- GH-RH = hormone de libération de l'hormone de croissance
- H3 = histone 3
- HE = coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
- HIER = Heat Induced Epitope Retrieval
- HIS = hybridation *in situ*
- *HPLC* = chromatographie en phase liquide haute performance
- HRP = peroxydase de raifort
- IGF = insuline-like growth factor
- IHC = immunohistochimie
- ipRGC = cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles
- JL = jour lactationnel
- KO = knock-out
- Kp = kisspeptine
- LC = chromatographie liquide
- LC-MS/MS = chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
- LH = hormone lutéinisante

- LOAEL = dose la plus faible avec effet nocif observé
- MAPK = *mitogen-activated protein* kinases
- MCT8 = protéine transporteuse des hormones thyroïdiennes
- Mel1C = récepteur à la mélatonine de type 1C
- miARN = microARN
- MS/MS = spectrométrie de masse en tandem
- MT (1, 2) = récepteur à la mélatonine
- NA = noradrénaline
- NAMP = naphtol AS-MX Phosphate
- NAN3 = azide de sodium
- NBT = nitroblue tetrazolium
- ND = non détectable
- NOAEL = dose sans effet toxique observable
- Npvf = précurseur du neuropeptide VF (précurseur peptidique apparenté au RFamide)
- NPY = neuropeptide Y
- NSC = noyaux suprachiasmatiques
- OMS = Organisation Mondiale de la Santé
- OMSA = Organisation Mondiale de la Santé Animale
- OP = 4-tert-octylphénol
- PA = tampon Tris salin 1X à pH 8,4
- PACAP = pituitary adenylate cyclase activating peptide
- PI3K = phosphoinositide 3-kinase
- PB = noyau parabranchial
- PBS = tampon phosphate salin
- PC = photopériode courte
- PCB = polychlorobiphényle
- PCOS = syndrome des ovaires polykystiques
- PCT3 = photopériode courte + T3
- PDE4D4 = phosphodiestérase de type 4
- PE = perturbateur endocrinien
- PEG = polyéthylène glycol
- PKA = protéine kinase A
- PL = photopériode longue
- PLP = périodate-lysine-paraformaldéhyde

PLT3 = photopériode longue + T3

PNUE = Programme des Nations Unies pour l'environnement

POMC = pro-opiomélanocortine

- POP = polluant organique persistant
- $PPAR\gamma = récepteur$ gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
- PPSU = polyphénylsulfone
- PRL = prolactine
- PRX = pregnane X receptor
- PT = *pars tuberalis*
- PVA = alcool polyvinylique
- PVN = noyau paraventriculaire
- REA = ratio d'efficacité alimentaire
- RFRP = *RF*-related peptide

rT3 = reverseT3

- RT-PCR = réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse
- $SEM = \acute{e}cart$ standard à la moyenne
- SGC = ganglions cervicaux supérieurs
- SHBG = protéines de transport des hormones sexuelles
- SBP = séparation balano-préputiale
- SSC = tampon citrate-sodium
- SST = somatostatine
- StAR = steroidogenic acute regulatory protein
- swPL = *switchback* PL
- T2 = diiodothyronine
- T3 = triiodothyronine
- T4 = thyroxine
- TBI = tampon tris-imidazole
- TBS = tampon tris salin
- TCDD = 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-para-dioxine
- TEF = *thyrotroph embryonic factor*
- TR = récepteur thyroïdien
- TRH = hormone thyréotrope
- TSH = thyréostimuline
- $TSH\beta = sous-unité \beta de la TSH$

TSH-R = récepteur à la TSHUCP = protéine découplanteVeh = véhiculeVMN = noyau ventromédian $VCO_2 = production de CO_2$

 $VO_2 = consommation en O_2$

Introduction

Chapitre 1 : Les rythmes saisonniers

I) Les animaux adaptent leur biologie aux saisons

1. Le phénomène de la rythmicité saisonnière

a. Les mouvements de la Terre à l'origine des saisons

La Terre gravite autour du soleil selon une trajectoire elliptique en une année et tourne autour de son axe, incliné à 23,5° par rapport à la verticale, en 24 h. Ces mouvements terrestres induisent des variations annuelles et journalières en quantité et en intensité des rayons lumineux perçus à la surface de la Terre. Ainsi, la durée d'éclairement quotidienne, appelée photopériode, change au cours de l'année du fait de la révolution et de l'inclinaison de la Terre, ce qui détermine les saisons (figure 1).



Figure 2 : Position de la Terre sur son orbite autour du Soleil.

Du cycle annuel des radiations solaires dérivent des cycles saisonniers secondaires de facteurs géophysiques tels que la température, les précipitations et les vents. La saisonnalité est particulièrement marquée dans les régions de hautes latitudes où la lumière du soleil et la température de l'air changent considérablement avec les saisons, mais est aussi présente dans les régions proches de l'équateur, qui présentent des remontées d'eau côtière saisonnière et une alternance de saisons sèches et humides.

Ces changements environnementaux impactent directement la disponibilité et la qualité des ressources alimentaires et par conséquent définissent le gain d'énergie potentiel pour les organismes.

Ainsi, les cycles astronomiques imposent des contraintes environnementales auxquelles les organismes se sont adaptés en développant des rythmes saisonniers de leurs fonctions biologiques.

b. Définition des rythmes saisonniers

Un rythme biologique est une variation périodique d'une fonction biologique d'un organisme vivant lui permettant d'anticiper le caractère périodique de l'environnement et de s'y adapter. La période d'un rythme, soit la durée séparant deux phénomènes identiques du cycle, définit le type de rythmes : les rythmes ultradiens présentent une période de moins de 24 h, les rythmes circadiens ont une période d'environ 24 h, et les rythmes infradiens ont une période de plus de 24 h. Sur la base de cette classification, un rythme saisonnier se définit comme un rythme infradien d'une période d'environ une année.

Les saisons se définissent comme des espaces de temps divisant l'année en quatre périodes : printemps, été, automne et hiver. Elles sont encadrées par des dates précises, les solstices et les équinoxes, qui correspondent à des moments où les rayons du Soleil sont plus ou moins inclinés sur l'axe de rotation de la Terre (figure 1). Lors des équinoxes, les rayons du Soleil sont parallèles à l'équateur donc la durée du jour et de la nuit sont égales partout sur Terre. Lors des solstices, les rayons du Soleil sont les plus inclinés sur l'équateur. Ces changements d'inclinaison induisent directement des changements de la photopériode, dite alors courte (jours courts) ou longue (jours longs), tout au long de l'année.

2. <u>Réponses biologiques aux saisons</u>

Pour survivre aux changements saisonniers de leur environnement, le défi majeur des organismes est de combiner croissance, reproduction et stockage d'énergie avec les saisons. Chez les animaux, il existe plusieurs formes d'adaptation aux saisons.

Certaines espèces migrent en fin d'été ou en automne vers des territoires dont le climat est adapté à leur système et riche en ressources alimentaires (Gwinner, 1986).

Une majorité d'espèces adaptent leurs caractéristiques physiologiques et comportementales avec l'objectif de concentrer leurs activités biologiques à des périodes de l'année où elles ont le plus de chances de réussir. Dans les zones tempérées, les activités de reproduction des animaux reprennent à une époque précise de l'année de manière à ce que les naissances se fassent au printemps. Certaines espèces, pour économiser leur énergie, diminuent leur activité métabolique en hiver et peuvent entrer en état de dormance, diapause ou hibernation. Les rythmes de reproduction et de croissance sont les principales adaptations du cycle biologique d'un individu aux saisons (Varpe *et al.*, 2017). D'autres

fonctions biologiques et comportementales comme les mues de pelage, l'immunité et les comportements sociaux et d'agression se sont aussi adaptées aux cycles des saisons chez de nombreux animaux (Gwinner, 1986).

a. Reproduction

La reproduction requiert un investissement énergétique conséquent pour les femelles, et augmente considérablement les risques de mortalité des individus. Ces risques sont notamment liés à la prédation lors des parades et des accouplements, aux complications des gestations et des parturitions et à l'épuisement nutritionnel des femelles (Norris et Jones, 1987). Ainsi, les stratégies de reproduction ont évolué au cours du temps pour optimiser le moment de la reproduction, de façon à ce que le plus grand nombre de descendants survivent et que les parents, surtout les femelles, soient capables de soutenir énergétiquement la génération de petits viables à moindre coût. Chez les reproducteurs saisonniers, les individus d'une population se reproduisent de manière synchrone, à une période spécifique de l'année, assurant que les naissances coïncident avec les périodes de meilleure disponibilité des ressources, typiquement au printemps ou en été (Norris et Jones, 1987 ; Bronson, 1985). Il existe donc un cycle de reproduction qui alterne entre périodes d'activité et de repos (anoestrus chez les femelles) des organes sexuels. La variation des durées de gestation entre espèces définit deux catégories de reproducteurs saisonniers : les reproducteurs de jours longs et de jours courts (figure 2).



Figure 3 : Les reproducteurs de jours longs et de jours courts.

Les reproducteurs de jours longs, comme les oiseaux et les petits mammifères, se reproduisent uniquement au printemps et en été, et la courte durée de la gestation ou de l'incubation de quelques semaines permet aux petits de naître au printemps ou à l'été. À l'inverse, les reproducteurs de jours courts, comprenant de plus grands mammifères comme le cerf et le mouton se reproduisent à l'automne car leur longue gestation (sur plusieurs mois) assure également la naissance des petits au printemps ou en été (Shinomiya *et al.*, 2014). Par conséquent, que les parents soient des reproducteurs de jours courts ou longs, leurs progénitures seront forcément élevées lorsque le climat est doux et que la nourriture est abondante, des conditions maximisant leur survie.

b. Métabolisme énergétique

De nombreux vertébrés présentent des adaptations physiologiques de leur métabolisme énergétique aux changements des saisons tels que des variations de prise alimentaire, de poids corporel, et des réserves lipidiques. De façon générale, la phase d'accumulation des réserves énergétiques et de prise alimentaire a lieu au printemps et en été, lorsque la nourriture est abondante, tandis que la phase catabolique a lieu en hiver (figure 3). La prise alimentaire diminue face à la rareté des ressources alimentaires et, pour survivre au froid, la dépense énergétique augmente pour produire la chaleur qui maintiendra la température corporelle (Lincoln *et al.*, 2002 ; Navarro-Masip *et al.*, 2023 pour revue). Une autre stratégie de survie aux périodes de pénurie énergétique est le ralentissement de l'état de vie, incluant des phénomènes de torpeur et d'hibernation, utilisés par une variété de rongeurs, insectivores, marsupiaux et oiseaux. Ces phénomènes se traduisent par l'alternance d'épisodes d'une baisse importante de la température corporelle (quelques heures à plusieurs jours) et d'épisodes d'éveil permettant de diminuer la dépense énergétique au cours des saisons froides.



Figure 4 : Variation photopériodique du poids corporel de hamsters djungariens. (PL = photopériode longue ; PC = photopériode courte), modifiée d'après Bernard *et al.*, 1997

En outre, les cycles saisonniers du métabolisme énergétique sont fonctionnellement synchronisés aux rythmes saisonniers de la reproduction, puisque la reproduction est une fonction très consommatrice d'énergie qui ne peut se mettre en place à des moments de faible disponibilité d'énergie. Par exemple, en hiver, le hamster djungarien cesse de se reproduire en même temps que sa prise alimentaire diminue et que ses réserves lipidiques sont catabolisées (Ebling, 2020). De la même façon, la torpeur et la reproduction surviennent généralement à des périodes bien distinctes. Chez certains hamsters, l'entrée en torpeur ou en hibernation requiert notamment une régression des gonades (Hoffman, 1964 ; McAllan et Geiser, 2014).

c. Pelage

Au cours des saisons, de nombreux mammifères issus des familles des léporidés, muroïdes, mustélidés et canins ainsi que certains oiseaux présentent des cycles de mue, définis par des variations de couleur et de densité des poils ou des plumes (figure 4). Les variations saisonnières du pelage optimisent les stratégies de camouflage et de prédation dans un environnement changeant et favorisent la thermorégulation en hiver (Zimova *et al.*, 2018). Par exemple, le hamster djungarien arbore un pelage fin, grisé et rayé en été qui devient uniformément blanc à poils denses en hiver (Figala *et al.*, 1973 ; Duncan et Goldman, 1984).



Figure 5 : Les variations saisonnières du plumage ou du pelage. (A) lagopède alpin, (B) lièvre variable, (C) hermine, (D) renard arctique. De Zimova et *al.*, 2018

24

d. Des adaptations physiologiques chez l'humain

L'adaptation des fonctions biologiques aux saisons chez l'humain est fréquemment débattue. L'humain est aujourd'hui relativement capable de contrôler son exposition à la lumière et à la température ainsi que son accès aux ressources alimentaires au cours de l'année. Il paraît donc relativement affranchi des contraintes environnementales saisonnières. Cependant, des variations saisonnières du taux de natalité, des fonctions cognitives et de l'occurrence de diverses maladies infectieuses, cardiovasculaires, métaboliques, psychiatriques et auto-immunes sont de plus en plus rapportées (Chen *et al.*, 2020 pour revue). De plus, un grand nombre de gènes humains présents dans les globules blancs et le tissu adipeux montrent des variations saisonnières marquées (Dopico *et al.*, 2015). En 1995, Bronson suggère que les causes de cette saisonnalité peuvent être d'ordre culturel, rythmée par les cycles de travail et de vacances des populations, et/ou d'ordre environnemental sous l'influence de la photopériode, du climat et de la disponibilité des ressources alimentaires, notamment dans les régions du monde les moins technologiquement développées. Néanmoins, l'influence des changements environnementaux saisonniers sur l'humain reste un sujet très discuté, et encore mal compris.

3. Indicateurs saisonniers

Pour synchroniser les fonctions biologiques aux saisons, les organismes doivent percevoir des indices prédictifs des variations des saisons. La notion de prédiction est centrale car les fonctions physiologiques saisonnières nécessitent de longues périodes de mise en place et ne peuvent pas être initiées instantanément. La fonction de reproduction, par exemple, comprend les étapes de développement des gonades, la parade nuptiale, la construction du nid et la gestation ou l'incubation (Gwinner, 1986). Les organismes doivent ainsi anticiper les changements environnementaux imminents en initiant la modulation de leurs activités biologiques à l'avance.

a. Photopériode

La photopériode est le facteur environnemental le plus fiable sur lequel se base un organisme pour prédire les conditions saisonnières. Au-delà de 10 à 20° de latitude, la variation de la durée du jour au fil de l'année est l'indicateur saisonnier le plus précis, qui reste stable d'année en année (Bronson, 1995 ; Nakane et Yoshimura, 2019, figure 5).



Figure 6 : Variation annuelle de la photopériode à Strasbourg en 2022. Réalisé à partir de <u>http://ptaff.ca/</u>

Au début du 20^{ème} siècle, des botanistes découvrent que la floraison de certaines plantes dépend de la durée du jour. Ils définissent les bases du photopériodisme comme étant les réponses physiologiques des organismes au changement de la durée du jour (Tournois, 1912 ; Garnel et Allard, 1920). Quelques années plus tard, plusieurs études documentent qu'un grand nombre de fonctions physiologiques présentes des réponses photopériodiques chez de nombreuses espèces animales incluant des pucerons, des oiseaux et des mammifères (Farner *et al.*, 1973 ; Gwinner, 1986 ; Goldman, 2001 pour revue).

Les espèces saisonnières sont dotées d'un système de mesure du temps photopériodique très sensible permettant de détecter des changements de la durée du jour aussi courts que 30 minutes (Nakane et Yoshimura, 2019) comme les faibles variations photopériodiques annuelles des régions équatoriales (dans le cas de certaines espèces d'oiseaux, Hau *et al.*, 1998, 2000 ; Wikelski *et al.*, 2000).

Ce système comporte un mécanisme de perception de l'alternance durée de lumière/durée de l'obscurité (*light input*), une horloge biologique (*circadian oscillator*) dont l'activité dépend de cette alternance longueur du jour/longueur de nuit, et des efférences neuroendocrines (*neuroendocrine outputs*) permettant la mise en place des adaptations physiologiques et comportementales (figure 6) (Bünning, 1936; Goldman, 2001; Nakane et Yoshimura, 2019). Les organismes modifient leurs

réponses photopériodiques à partir d'une durée du jour sur 24 h qui est appelée photopériode critique, et dont la valeur dépend des espèces. Par exemple, la croissance testiculaire est observée à des photopériodes de 12,5 h ou plus pour les hamsters syriens (Gaston et Menaker, 1967), 13 h ou plus pour les hamsters djungariens (Hoffman, 1982), et 11,5 h ou plus pour les cailles japonaises (Follett et Maung, 1978). Pour une même espèce, la photopériode critique peut aussi varier en fonction de la latitude où se trouvent les individus de sorte que la réponse physiologique coïncide avec la disponibilité des ressources (Hut *et al.*, 2013).



Figure 7 : Concept du système de mesure du temps photopériode. Modifié à partir de Nakane et Yoshimura, 2019

b. Flexibilité des réponses photopériodiques

D'un point de vue écophysiologique, l'influence d'autres facteurs écologiques présentant des modifications saisonnières, telles que la température ambiante et la disponibilité en nourriture, sur les adaptations photopériodiques peuvent apporter une flexibilité de la réponse physiologique aux variations de l'environnement photopériodique d'une année sur l'autre (Steinlechneir et Niklowitz, 1992). Pour de nombreuses espèces vivant dans des zones tempérées, le rythme de nombreuses étapes du cycle de vie corrèle avec la température ambiante. Par exemple, au cours des années les plus chaudes, les biches mettent bas plus tôt et les marmottes sortent de l'hibernation et sèvrent leur progéniture également plus tôt (Caro *et al.*, 2013). Des expériences en conditions contrôlées de laboratoire ont démontré que la température peut moduler les réponses photopériodiques du système reproducteur et du pelage. Par exemple, l'exposition de hamsters à des basses températures décale leur photopériode critique de croissance testiculaire de 2 h (Steinlechneir et Niklowitz, 1992) et accélère l'atrophie testiculaire induite par le raccourcissement des journées (Pévet *et al.*, 1995). À l'opposé, l'exposition à des températures élevées fait persister plus longtemps le pelage d'été des belettes (Rust, 1962) ou des souris (Lynch, 1973).

Un autre exemple de flexibilité implique l'historique photopériodique d'un individu. En effet, quand la même photopériode survient à deux reprises au cours de la même année (aux équinoxes de printemps et d'automne) la durée du jour devient un indicateur moins prédictible des changements saisonniers, et l'adaptation physiologique à ces photopériodes intermédiaires dépend alors de l'historique photopériodique de l'individu. Ainsi, une photopériode de 13,5 h induit une régression testiculaire des hamsters djungariens préalablement adaptés à une photopériode longue, alors qu'elle active la croissance testiculaire des animaux adaptés à une photopériode courte (Prendergast *et al.*, 2000). Aussi, la réponse métabolique et reproductive de petits hamsters djungariens hébergés à une même photopériode intermédiaire sera différente selon l'historique photopériodique maternel (Saenz de Miera *et al.*, 2017 ; van Dalum *et al.*, 2019).

Des facteurs alimentaires et sociaux peuvent aussi moduler la réponse physiologique à ces photopériodes intermédiaires. Par exemple, la restriction alimentaire et l'hébergement social en groupes induisent une régression des gonades chez le hamster djungarien maintenu dans une photopériode intermédiaire (Paul *et al.*, 2006).

D'autres facteurs environnementaux influencent les réponses physiologiques saisonnières dans les environnements équatoriaux et aquatiques, comme les précipitations, la salinité, la teneur en ions et le débit de l'eau (Norris et Jones, 1987).

c. Cas particulier de rythmes endogènes

Pour ajuster précisément leur état physiologique aux saisons, certains organismes à durée de vie longue utilisent une horloge endogène circannuelle (avec une période proche d'un an) en plus du système de mesure du temps photopériodique. Ainsi, il existe des rythmes endogènes circannuels de plusieurs fonctions biologiques (reproduction, régulation du poids corporel, hibernation, migration et croissance du pelage) auto-entretenus en conditions constantes de photopériode, température et ressources alimentaires (Ducker *et al.*, 1973 ; Gwinner, 1986 ; Lincoln *et al.*, 2006). L'intégration d'un signal photopériodique à certaines périodes de l'année permet de synchroniser l'horloge circannuelle avec la période environnementale annuelle (Zucker, 2001 ; Monecke *et al.*, 2009, 2010, 2013).

Il existe un autre phénomène saisonnier endogène, appelé photoréfraction, qui permet la réactivation du phénotype de photopériode longue (ou courte) alors que les individus sont maintenus en photopériode inhibitrice courte (ou longue). Par exemple chez des hamsters syriens ou djungariens maintenus constamment en photopériode courte inhibitrice, le phénotype reproducteur et métabolique de type photopériode longue réapparaît après environ 20 semaines de photopériode courte (Reiter, 1972 ; Stetson *et al.*, 1976).

Ainsi, la saisonnalité biologique a probablement évolué en conséquence de l'amélioration de la valeur sélective (*fitness*) des individus qui adaptent leur comportement et leur physiologie aux contraintes environnementales fluctuant au cours de l'année. Pour se repérer dans le calendrier des saisons, les animaux utilisent la photopériode qui est le facteur environnemental le plus fiable.

II) <u>Mécanismes photoneuroendocriniens de l'intégration du message photopériodique</u>

1. L'axe rétino-hypothalamo-pinéal

a. La rétine transduit le message photique en influx nerveux

Chez les mammifères, le signal lumineux est transduit en un influx électrique par les photorécepteurs de la couche externe de la rétine. Ceux-ci comprennent les cônes et les bâtonnets, sensibles aux couleurs et aux intensités lumineuses respectivement. Ils sont composés de pigments photosensibles, les opsines, capables d'absorber les photons et d'activer une cascade biochimique faisant varier le potentiel de membrane des photorécepteurs. Dans les années 2000, plusieurs études ont mis en évidence que la phototransduction rétinienne classique n'est pas responsable de la détection de l'alternance jour/nuit permettant la synchronisation des rythmes biologiques car celle-ci est conservée chez des personnes aveugles et des souris dont la couche de photorécepteurs est dégénérée (Freedman et al., 1999 ; Lucas et al., 1999). Ce signal lumineux photopériodique est détecté par un système non visuel impliquant un troisième type de photorécepteurs, appelés cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGC) (Provencio et al., 1998; Berson et al., 2002). Les ipRGC sont localisées dans la couche rétinienne interne des cellules ganglionnaires et contiennent le pigment photosensible mélanopsine (Hattar et al., 2002). La lumière active la mélanopsine et déclenche une cascade de signalisations dépendantes des protéines G qui provoquent une dépolarisation de la membrane des ipRGC. Les axones d'un sous-type de ipRGC forment le tractus rétino-hypothalamique qui innerve directement les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus. Les NSC contiennent l'horloge circadienne principale dont l'activité endogène est synchronisée grâce à la libération de glutamate et du pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) par les terminaisons nerveuses des ipRGC (Hannibal et al., 2000).

b. Les noyaux suprachiasmatiques mesurent la longueur du jour

L'horloge biologique centrale, localisée dans le NSC, contient 15 à 20 000 cellules localisées de part et d'autre du 3^{ème} ventricule au-dessus du chiasma optique (Reppert et Weaver, 2001 ; Lowrey et Takahashi, 2004). Pratiquement toutes les cellules des NSC contiennent une machinerie moléculaire qui, grâce à des boucles de rétroactions transcriptionnelles positives et négatives de gènes de l'horloge
circadienne (*Clock, Bmal1, Per1-3, Cry 1-2, Rev-erba, Rorβ*) oscillent avec une période circadienne (proche de 24 h, figure 7). La valeur de la période est généralement caractéristique d'une espèce mais peut présenter des différences individuelles et au cours de la vie (Brown et Schibler, 2006). Les informations d'alternance lumière/obscurité environnementales, qui ont une période de 24 h (rythme journalier), transmises par le tractus rétino-hypothalamique, entraînent quotidiennement l'horloge moléculaire à une période exacte de 24 h. La fixation de PACAP et du glutamate sur leurs récepteurs dans les NSC active une cascade de voies de signalisation régulant la transcription des gènes horloges *Per1-2* (Hannibal et Farenhkrug, 2006, Sumova *et al.*, 2004 pour revue). Les signaux rythmiques de sortie de l'horloge des NSC sont en aval transmis par différentes voies neuronales et humorales vers différentes aires cérébrales et organes périphériques pour ajuster les rythmes biologiques endogènes à l'environnement lumineux (Yoo *et al.*, 2004 ; Mohawk *et al.*, 2012). Ainsi, les rythmes physiologiques et comportementaux que l'horloge orchestre, tels que les cycles veille/sommeil, l'activité cardiovasculaire, le métabolisme énergétique, la reproduction, l'humeur et la plupart des hormones circulantes, sont synchronisés avec la période de 24 h des rythmes des jours astronomiques (Mohawk *et al.*, 2012).



Figure 8 : Boucle de rétrocontrôle moléculaire des noyaux suprachiasmatiques.

La boucle de rétroaction transcriptionnelle autorégulatrice impliquant les activateurs CLOCK et BMAL1 et leurs gènes cibles *Per (1,2), Cry (1,2),* dont les protéines forment un complexe répresseur PER/CRY à rétroaction négative, constitue le mécanisme central de l'horloge circadienne. Outre cette boucle de rétroaction transcriptionnelle centrale, il existe une autre boucle de rétroaction pilotée par CLOCK/BMAL1 impliquant *Rev-erba* (et *Rora*, non représenté) qui réprime la transcription de *Bmal1*. CLOCK/BMAL1 régulent également de nombreux gènes cibles en aval, connus sous le nom de gènes contrôlés par l'horloge.

L'analyse de l'expression des gènes horloges et des gènes contrôlés par l'horloge dans les NSC a montré qu'ils répondent également aux changements annuels de la photopériode. En phase lumineuse,

des gènes horloges et contrôlés par l'horloge présentent notamment des périodes ou des amplitudes plus longues chez plusieurs espèces de hamsters (Johnston *et al.*, 2005 ; Tournier *et al.*, 2003 ; 2007) et chez des brebis (Lincoln *et al.*, 2002) exposées à une photopériode longue (figure 8). Par ailleurs, la mesure de l'activité électrique extracellulaire de NSC en culture montre un pic journalier d'activité plus long si l'explant est prélevé chez un animal en photopériode longue comparée à un NSC prélevé sur un individu adapté à la photopériode courte (VanderLeest *et al.*, 2007). Par conséquent, les gènes de l'horloge biologique dans les NSC sont sensibles au temps saisonnier et participent au décodage de l'information saisonnière.



Figure 9 : La photopériode module l'expression rythmique d'horloge circadienne des NSC.

Les graphiques montrent les profils d'expression sur 24 de l'ARNm des gènes de l'horloge (*Per1, Cry1 et Rev-erba*) et des gènes contrôlés par l'horloge (*AVP*, vasopressine) dans le SCN du hamster djungarien en photopériode longue (ligne continue) ou en photopériode courte (ligne pointillée).

De Hazlerigg et Simonneaux, 2015 (adapté de Johnston et al., 2005)

c. La mélatonine est l'hormone des saisons

Parmi les cibles des NSC, la glande pinéale constitue un relai central dans la transduction du message photopériodique saisonnier en un message endocrine. En effet, l'activité de la glande pinéale dépend de celle de l'horloge centrale *via* une voie multi-synaptique. Cette voie implique la stimulation des neurones des noyaux para-ventriculaires de l'hypothalamus (Jác *et al.*, 2000) pendant la phase nocturne - et leur inhibition par un influx GABAergique en phase lumineuse – par les NSC.

Cette activité conduit à une stimulation des neurones préganglionnaires sympathiques localisés dans la partie intermédiolatérale de la moelle épinière, qui eux-mêmes stimulent des neurones des ganglions

cervicaux supérieurs qui libèrent de la noradrénaline dans la glande pinéale pendant la nuit (Kalsbeek *et al.*, 1999, 2000 ; Kappers, 1960, figure 9).

La glande pinéale est une petite glande endocrine contenant majoritairement des pinéalocytes capables de synthétiser et sécréter la mélatonine uniquement la nuit (Klein et Moore, 1979). Les afférences noradrénergiques permettent la genèse du rythme mélatoninergique (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Brièvement, l'activation nocturne des récepteurs noradrénergiques $\alpha 1$ et $\beta 1$ des pinéalocytes active une voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et du calcium menant à l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Sugden et al., 1987). La PKA induit, par des modifications transcriptionnelles et/ou traductionnelles et posttraductionnelles (mécanismes différents selon les espèces) l'activation d'une enzyme limitante participant à la synthèse de la mélatonine, l'arylalkylamine N-acétyl transférase (AA-NAT) (Illnerova et Vaněcek, 1985; Namboodiri et al., 1985; Hazlerigg et Simonneaux, 2015 pour revue, figure 9). L'activité de l'AA-NAT présente une demi-vie très brève (de l'ordre de 3 à 5 min), ce qui permet une diminution instantanée de son activité, et donc de la synthèse de mélatonine lorsque la stimulation noradrénergique s'achève en fin de nuit. En parallèle, la mélatonine n'est pas stockée dans les pinéalocytes mais est continuellement diffusée dans la circulation sanguine où elle est rapidement hydroxylée par des enzymes hépatiques puis excrétée dans les urines, lui conférant une demi-vie d'environ 20 minutes (Gibbs et Vriend, 1981). De ce fait, les rythmes de sécrétion de la mélatonine reflètent quasi-immédiatement ses rythmes de synthèse dépendants du message photopériodique acheminé par l'axe rétino-hypothalamo-pinéal.



Figure 10 : Schéma de l'axe rétino-hypothalamo-pinéal et de la synthèse de la mélatonine par les pinéalocytes.

Le signal lumineux est transduit dans la rétine puis transmis aux noyaux suprachiasmatiques (NSC) et paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Le message est véhiculé aux ganglions cervicaux supérieurs (SGC) dont les neurones à noradrénaline (NA) projettent vers la glande pinéale dont les pinéalocytes synthétisent la mélatonine en période nocturne uniquement. PL=photopériode longue ; PC=photopériode courte.

Ainsi, la mélatonine, outre son rôle en tant que messager circadien, est un véritable messager endocrinien du temps photopériodique puisque la durée de sa synthèse et de sa sécrétion nocturne est positivement corrélée à la durée de la nuit. La quantité de mélatonine sécrétée est très variable entre espèces et même entre individus d'une même espèce. Ainsi c'est la durée du pic nocturne, plutôt que son amplitude, qui participe principalement à l'encodage du temps photopériodique. En effet, des approches combinant des pinéalectomies et des infusions sous-cutanées de mélatonine à des durées variables chez des hamsters djungariens (Goldman *et al.*, 1984) et des brebis (Bittman et Karsch, 1984) ont mis en évidence que seule la durée du pic nocturne de la mélatonine porte le message endocrinien des saisons.

En somme, le message photique saisonnier est détecté et transduit en un message nerveux par les ipRGC localisées dans la rétine, encodé par l'horloge biologique centrale, puis transmis à la glande pinéale qui le traduit en un message endocrinien mélatoninergique.

Dès les années 1960, il a été démontré que la mélatonine joue un rôle central dans la synchronisation des réponses physiologiques avec la photopériode. En effet, une pinéalectomie empêche totalement l'inhibition de l'activité reproductrice induite par les jours courts chez les hamsters syriens (Hoffman et Reiter, 1965) et des études utilisant les infusions programmées de mélatonine ont confirmé l'importance de la durée du pic nocturne de mélatonine dans la synchronisation de l'activité reproductrice, la régulation du poids corporel et le changement de pelage (Bartness *et al.*, 1993 ; Morgan *et al.*, 2006).

d. Les cibles mélatoninergiques impliquées dans la transmission du message saisonnier

Chez les mammifères, la mélatonine se fixe principalement sur deux types de récepteurs couplés à des protéines G_i, nommés MT1 et MT2 (Klosen *et al.*, 2019). Des expériences d'autoradiographie *in vitro*, d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont mis en évidence que ces récepteurs sont présents dans de nombreuses régions cérébrales (hypothalamus dont les NSC, hypophyse, rétine, cortex, cervelet, habénula, hippocampe...) et plusieurs organes périphériques, avec des distributions dépendantes des espèces. Néanmoins, chez tous les mammifères étudiés, à l'exception de l'humain, il existe une très forte densité de récepteurs mélatoninergiques dans la *pars tuberalis*, une structure endocrine de l'adénohypophyse (Klosen *et al.*, 2002 ; Dardente *et al.*, 2003 ; Hazlerigg et Simonneaux, 2015 pour revue, figure 10). En outre, l'expression des récepteurs MT1 de la *pars tuberalis* des hamsters européens (Dardente *et al.*, 2003) et djungariens (Schuster *et al.*, 2000) varie en fonction de la photopériode. Des données sur des hamsters djungariens naturellement déficients en MT2 (Weaver *et al.*, 1996) ou sur des souris C3H proficientes en mélatonine *Knock-out* (KO) pour MT2 ou MT1 (Yasuo *et al.*, 2009), démontrent que les effets neuroendocriniens saisonniers de la mélatonine sont médiés par le récepteur MT1.



Figure 11 : Autoradiographie localisant la présence du récepteur MT1.

(A) le MT1 est localisé dans les NSC et (C) la *pars tuberalis* (PT) de hamsters djungariens. De Schuster *et al.*, 2000.

2. La pars tuberalis : une structure endocrine clef dans l'intégration de la photopériode

Le décodage du signal endocrinien de la mélatonine dans la *pars tuberalis* permet, par le biais indirect d'autres hormones, notamment la prolactine, les hormones thyroïdiennes et les stéroïdes sexuels, d'adapter en aval les fonctions biologiques aux saisons. En effet, la glande pinéale, l'hypophyse, la glande thyroïde et les gonades sont depuis longtemps considérées comme essentielles pour les fonctions biologiques saisonnières chez les mammifères. De nombreuses études neuroanatomiques et physiologiques ont notamment révélé le lien fonctionnel entre la mélatonine, la thyréostimuline (TSH) et la triiodothyronine (T3) pour synchroniser de nombreuses fonctions biologiques avec les saisons.

a. L'expression de la TSHβ par la *pars tuberalis* est régulée par les modifications photopériodiques de la mélatonine

La *pars tuberalis* est une structure endocrine de l'adénohypophyse qui enrobe la tige pituitaire et s'étend le long de la face ventrale de l'éminence médiane. Elle contient plusieurs types de cellules sécrétrices, dont les cellules thyréotropes, en contact étroit avec les capillaires du système vasculaire porte et les terminaisons nerveuses hypothalamiques de l'éminence médiane (Wittkowski *et al.*, 1999, figure 11). Ces cellules produisent et sécrètent la TSH, une hormone qui se compose d'une sous-unité glycoprotéique α (α -GSU) et d'une sous-unité β (TSH β).





À la fin des années 80, Wittkowski et coll. rapportent des changements morphologiques des cellules sécrétrices de la *pars tuberalis* (Wittkowski *et al.*, 1984) ainsi que des variations de leur production de TSH, en fonction de la photopériode d'exposition de hamsters djungariens (Wittkowski *et al.*, 1988). Ces études combinées aux découvertes postérieures de l'expression du MT1 dans la *pars tuberalis* ont conduit à des expériences démontrant que la synthèse de la TSH par les cellules thyréotropes de la *pars tuberalis* dépend des variations photopériodiques dans la durée de liaison de la mélatonine sur les récepteurs MT1 (figure 12).

En effet, l'activation prolongée des récepteurs MT1 en photopériode courte inhibe l'expression de la TSHβ par les cellules thyréotropes (Bockmann *et al.*, 1996, Dardente et *et al.*, 2003).



Figure 13 : Micrographies de marquages à l'αGSU et la TSHβ dans la *pars tuberalis* de hamsters d'Europe hébergés en photopériode longue (LP) et en photopériode courte (SP). De Dardente *et al.*, 2003.

Des études complémentaires ont mis en évidence l'implication d'un mécanisme moléculaire circadien permettant aux changements photopériodiques de la longueur du pic nocturne de mélatonine de réguler l'expression de la $TSH\beta$ (Nakao *et al.*, 2008 ; Dardente *et al.*, 2010). En effet, la transcription de $TSH\beta$ dépend des cofacteurs de transcription *thyrotroph embryonic factor* (TEF) et *eyes absent 3* (EYA3) dont l'expression est sous le contrôle circadien des protéines horloges et a lieu 12h après le début de la phase nocturne (Wood *et al.*, 2015). Or, un pic long de mélatonine en hiver/photopériode courte inhibe l'expression des gènes horloges et par conséquent réduit l'activation de la transcription d'EYA3, ce qui conduit à une diminution de l'expression de la $TSH\beta$. A l'inverse, le court pic de mélatonine en été/photopériode longue ne coïncide pas avec la phase de transcription de *eya3*, donc ne permet pas son inhibition. La synthèse d'EYA3, possible après la nuit courte, va permettre la transcription de la $TSH\beta$ (figure 13) (Dardente *et al.*, 2010).



Figure 14 : Modèle de la régulation photopériodique de l'expression de la TSHβ. Traduit depuis Dardente *et al.*, 2010.

La TSH synthétisée dans la *pars distalis* de l'adénohypophyse répond au contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien classique et agit sur la glande thyroïdienne pour stimuler la sécrétion et la production d'hormones thyroïdiennes (Fliers *et al.*, 2014 pour revue). Or, la TSH de la *pars tuberalis* est insensible à l'influence de l'hormone thyréotrope (TRH) hypothalamique et des rétrocontrôles négatifs de la T3, mais répond uniquement à la mélatonine (Bockmann *et al.*, 1997). De plus, du fait de modifications post-traductionnelles différentes entre les TSH des deux structures suscitées, la TSH de la *pars tuberalis* libérée dans la circulation sanguine ne stimule pas la glande thyroïde car elle forme des macro-complexes avec de l'immunoglobuline ou de l'albumine conduisant à une perte de sa bioactivité (Ikegami *et al.*, 2014).

b. Régulation photopériodique de la prolactine

Chez les mammifères, des études suggèrent que la *pars tuberalis* participe aussi au relai de l'information mélatoninergique régulant les cycles saisonniers de la prolactine. Les cycles de cette hormone, produite par les cellules lactotropes de la *pars distalis*, régulent d'importantes fonctions physiologiques saisonnières telles que la lactation, l'implantation des embryons, le comportement de reproduction et les cycles de mue du pelage (Badura et Goldman, 1992 ; Lincoln et Clarke, 1994 ; Morgan, 2000). Un modèle propose que le message mélatoninergique est intégré dans la *pars tuberalis* sous un contrôle circadien et module la sécrétion de « tubéraline(s) » qui active(nt) la synthèse et la sécrétion de prolactine par la *pars distalis* (Morgan, 2000 ; Lincoln *et al.*, 2003 ; Johnston, 2004 ; Dardente, 2007 pour revues). Il existe plusieurs hypothèses sur la nature de la/des tubéraline(s) qui contrôle(nt) les cycles saisonniers de prolactine, tels que la substance P, la protéine sécrétrice TAFA ou des endocannabinoïdes, mais sans preuves fonctionnelles identifiées à ce jour (Korf, 2018 pour revue).

En somme, la *pars tuberalis* est la structure neuroendocrine indispensable à la traduction du message mélatoninergique. Sa localisation anatomique la rend tout indiquée pour exercer ses activités de sécrétion de manière antérograde sur la *pars distalis via* le système porte hypophysaire. Elle y régule notamment, par le biais de mécanismes encore non élucidés, le contrôle saisonnier de la prolactine. Néanmoins, depuis les années 2000, plusieurs travaux ont démontré que la *pars tuberalis* utilise une voie atypique rétrograde hypohyso-hypothalamique liant fonctionnellement la TSH tubéralienne, les hormones thyroïdiennes et la coordination saisonnière de plusieurs réponses physiologiques.

3. <u>Rôle des hormones thyroïdiennes dans le contrôle central des fonctions saisonnières</u> a. Rôle des hormones thyroïdiennes dans les fonctions saisonnières

Bien avant d'élucider le rôle de la mélatonine dans l'intégration du signal saisonnier, les biologistes démontraient déjà que les hormones thyroïdiennes étaient indispensables à la régulation de réponses saisonnières telles que la reproduction. En effet, la thyroïdectomie altère les variations saisonnières de croissance des gonades chez le canard (Benoit, 1936), l'étourneau (Wieselthier et Van Tienhoven, 1972) et la caille (Follett et Nicholls, 1985) et empêche le mouton de devenir réfractaire aux jours courts et donc de cesser sa saison de reproduction (Moenter et al., 1991). En plus de jouer des rôles déterminants dans le développement cérébral et la croissance, il est aussi connu depuis près d'un siècle que les hormones thyroïdiennes régulent le métabolisme de base et la thermorégulation (Lopez et al., 2013), qui sont des processus saisonniers. Des expériences d'infusions intracérébroventriculaires et sous-cutanées d'hormones thyroïdiennes chez la brebis ont démontré que les hormones thyroïdiennes exercent leurs effets sur la reproduction saisonnière au niveau du système nerveux central (Viguié et al., 1999). Des approches similaires ont montré que la présence de micro-implants diffusant de la T3 dans l'hypothalamus empêche la régression gonadique, la perte de poids et les cycles de torpeur induits par une photopériode courte chez des hamsters djungariens (Barrett et al., 2007; Murphy et al., 2012; figure 14). Ainsi, les hormones thyroïdiennes jouent un rôle essentiel dans l'intégration et la coordination des réponses physiologiques aux changements des saisons.



Figure 15 : L'administration centrale de T3 empêche la régression testiculaire et la perte de poids corporel induite par la photopériode courte (PC).

Modifié de Barrett *et al.*, 2007. PC = photopériode courte ; PCT = photopériode courte + T3 ; PL = photopériode longue ; PLT = photopériode longue + T3.

b. Voie rétrograde : la TSH sécrétée par la *pars tuberalis* régit le métabolisme de la T3 dans l'hypothalamus médiobasal

Les concentrations d'hormones thyroïdiennes dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien ne présentent pas de variations marquées en fonction des saisons (Dardente *et al.*, 2014), suggérant une régulation très locale de ces hormones. À cet égard, il a été découvert chez la caille que des enzymes du métabolisme des hormones thyroïdiennes, les déiodinases, sont exprimées dans la région médio-basale de l'hypothalamus et que cette expression varie considérablement en fonction des photopériodes auxquelles les cailles sont exposées (Yoshimura *et al.*, 2003). Il existe plusieurs types de déiodinases qui activent ou inactivent les hormones thyroïdiennes. La déiodinase 2 (Dio2) convertit la thyroxine (T4), peu bioactive, en une forme bioactive T3, tandis que la déiodinase 3 (Dio3) convertit la T3 en *reverse*T3 (rT3) ou en diiodothyronine (T2) qui sont inactives (figure 15). Chez la caille (Yoshimura *et al.*, 2003), mais aussi chez des mammifères saisonniers comme le mouton (Saenz de Miera *et al.*, 2013), le hamster djungarien (Watanabe *et al.*, 2004), le hamster syrien (Revel *et al.*, 2006) et le hamster européen (Hanon *et al.*, 2010) les régulations photopériodiques de Dio2 et Dio3 sont opposées : Dio2 est fortement exprimée en photopériode longue alors que Dio3 ne l'est qu'en photopériode courte. Il est à noter qu'il existe des différences interspécifiques du ratio Dio2/Dio3 mais que ce ratio va toujours dans le sens d'une augmentation de la formation de T3 en photopériode longue/été.



Figure 16 : Le métabolisme des hormones thyroïdiennes par les déiodinases 2 et 3 (Dio2 et Dio3).

Chez le rat, une plus forte expression des déiodinases a été localisée au sein d'une population de cellules appelées tanycytes. Ces cellules sont situées le long du 3^{eme} ventricule, à l'interface de l'hypothalamus médio-basal, de l'éminence médiane et du liquide céphalo-rachidien (Tu *et al.*, 1997, Guadano-Ferraz *et al.*, 1997). Chez les espèces saisonnières, il a ensuite été montré que ce sont uniquement les tanycytes qui expriment les Dio2 et Dio3 (Yoshimura *et al.*, 2003). Ces cellules présentent aussi des variations photopériodiques de la protéine transporteuse des hormones thyroïdiennes MCT8, qui est plus exprimée en photopériode courte qu'en photopériode longue chez le hamster djungarien (Herwig *et al.*, 2008, 2013). Ainsi, en photopériode longue, le transport et le métabolisme des hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus favorisent une augmentation locale de la concentration en T3.

La découverte majeure de la présence des récepteurs à la TSH (TSH-R) dans les tanycytes a permis de lier fonctionnellement la sécrétion mélatonine-dépendante de la TSH par la *pars tuberalis* et le métabolisme saisonnier des hormones thyroïdiennes hypothalamiques (Nakao *et al.*, 2008 ; Hanon *et al.*, 2008). Ce modèle a été confirmé par le fait que des injections intracérébroventriculaires de TSH induisaient une augmentation de l'expression de Dio2 et une recrudescence de la croissance des gonades chez des cailles (Nakao *et al.*, 2008), des brebis (Hanon *et al.*, 2008) ; des hamsters européens (Hanon *et al.*, 2010) djungariens (Klosen *et al.*, 2013, figure 16) et syriens (Yasuo *et al.*, 2009) ; des rats (Ross *et al.*, 2011) et des souris (Ono *et al.*, 2008) exposés à une photopériode courte. La liaison de la TSH sur son récepteur tanycytaire couplé aux protéines G_s stimule la voie de signalisation AMPc/ERK1/2 (kinases impliquées dans la régulation des signaux extracellulaires) pour augmenter l'expression de Dio2 (Bolborea *et al.*, 2015). L'expression photopériodique de Dio3 semble aussi dépendante des effets de la TSH sur son récepteur puisque l'administration centrale de TSH diminue l'expression de Dio3 chez le rat F344 (Helfer *et al.*, 2013) et que l'administration de mélatonine (mimant une photopériode courte) induit l'expression de Dio3 chez des souris *wild-type* mais pas chez des souris KO pour *TSH-R* (Ono *et al.*, 2008). Les mécanismes régulant l'expression photopériodique de Dio3 restent encore à

définir, car Milesi et coll. (2017) ont rapporté que l'inhibition précoce de Dio3 en photopériode longue survient avant l'induction de l'expression de la TSH et de Dio2 chez les hamsters djungarien et syrien.



Figure 17 : L'administration centrale de TSH augmente l'expression de Dio2 chez des hamsters djungariens exposés à une photopériode courte. De Klosen *et al.*, 2013.

En résumé, ces dernières décennies de recherche ont permis de définir un modèle mécanistique de l'intégration du message photopériodique par la *pars tuberalis* considérablement conservé entre espèces. Chez les mammifères, l'allongement du pic nocturne de mélatonine en jours courts inhibe la synthèse du co-activateur transcriptionnel EYA3 de la TSH β , conduisant à une inhibition de la production de TSH, alors que le pic court de mélatonine en jours longs permet la synthèse de TSH dépendante de EYA3. La TSH agit de façon rétrograde sur ses récepteurs localisés dans les tanycytes pour induire l'expression de Dio2 et/ou inhiber l'expression de Dio3 conduisant à une augmentation locale des concentrations hypothalamiques de T3 en jours longs d'été. Chez les oiseaux, le contrôle saisonnier de la synthèse de la TSH ne dépend pas de la mélatonine mais de la durée de la lumière probablement perçue par des photorécepteurs profonds, les *Deep Brain Photoreceptors*. La voie d'action de la TSH sur la synthèse de T3 est similaire à celle mammifères (Shinomiya *et al.*, 2014 pour revue, figure 17).



Figure 18 : Schéma récapitulatif de la voie TSH/déiodinases/hormones thyroïdiennes intégrant le message photopériodique chez les mammifères et les oiseaux. Adapté de Dardente *et al.*, 2014.

4. <u>Régulations neuroendocriniennes de la physiologie saisonnière</u>

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la synchronisation saisonnière des fonctions reproductrices et métaboliques, l'identification des cibles cellulaires et moléculaires de la T3 est indispensable, et fait l'objet de nombreuses recherches depuis ces 20 dernières années.

a. La régulation saisonnière de l'axe gonadotrope i. L'axe gonadotrope

L'axe gonadotrope intervenant dans la régulation de la reproduction est constitué d'un ensemble de structures : l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades.

L'activité de reproduction dépend d'un groupe de neurones dispersés dans la région pré-optique de l'hypothalamus et dont la majorité des projections nerveuses atteignent l'éminence médiane pour libérer l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) dans les vaisseaux sanguins du système porte-hypophysaire (Herbison, 2016 pour revue, figure 18). L'équipe d'Herbison a montré, chez la souris, que les projections des neurones à GnRH vers l'éminence médiane sont atypiques, partageant des caractéristiques à la fois axonale et dendritique qui ont été appelées « dendrons » (Campbell *et al.*, 2009 ; Herde *et al.*, 2013). La GnRH est sécrétée de manière pulsatile afin d'éviter une désensibilisation de ses récepteurs cependant, chez les femelles, à un moment du cycle reproducteur, sa fréquence de décharge augmente jusqu'à une libération massive qui déclenchera l'ovulation (Herbison, 2016, figure 18).

Les mécanismes à l'origine du caractère pulsatile de la sécrétion de GnRH (*GnRH pulse generator*) impliquent potentiellement une activité rythmique endogène des neurones à GnRH et/ou des régulations extrinsèques dans l'environnement des neurones à GnRH. Un manque d'évidence d'une activité synchrone intrinsèque de ces neurones hypothalamiques (Constantin *et al.*, 2013), l'observation que des explants hypothalamiques dépourvus des corps cellulaires des neurones à GnRH maintiennent une sécrétion pulsatile (Purnelle *et al.*, 1997) ainsi que la capacité des dendrons à recevoir des connexions synaptiques favorisent l'hypothèse d'un générateur de pulsatilité extrinsèque. La description des afférences régulant l'activité des neurones à GnRH, incluant des afférences glutamatergiques, GABAergiques, neuropeptidergiques et gliales, sera détaillée plus loin dans le contexte de la régulation saisonnière des neurones à GnRH.

La GnRH se lie à son récepteur localisé sur les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse pour stimuler la production et la libération des gonadotrophines : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Ces gonadotrophines, libérées dans la circulation sanguine, se lient sur leurs récepteurs spécifiques exprimés notamment par les gonades pour moduler la gamétogénèse et la stéroïdogénèse (œstrogènes, progestérone et testostérone). Chez les femelles, la FSH initie la maturation des follicules ovariens qui sécrètent de plus en plus d'œstrogènes au cours de leur maturation. La LH, dont les concentrations sanguines augmentent de façon importante et transitoire en fin de phase folliculaire, déclenche l'ovulation. Après l'ovulation, la LH assure la transformation du follicule en corps jaune qui produira la progestérone. Chez les mâles, la FSH intervient dans la spermatogénèse en stimulant les cellules de Sertoli des tubes séminifères et la LH induit la prolifération et la maturation des cellules de Leydig qui synthétisent la testostérone. La FSH stimule aussi la production de l'hormone inhibine par les ovaires et les testicules.

Les stéroïdes sexuels et l'inhibine exercent des rétrocontrôles sur l'axe hypothalamohypophysaire. Leur rétrocontrôle sur les cellules gonadotropes hypophysaires est inhibiteur alors qu'il est variable dans l'hypothalamus. Chez la femelle, lorsque la concentration circulante d'œstrogènes est faible, le rétrocontrôle sur l'hypothalamus est inhibiteur mais lorsque la concentration atteint un seuil élevé, le rétrocontrôle oestrogénique devient excitateur pour permettre l'activation massive des neurones à GnRH conduisant au déclenchement du pic de LH pré-ovulatoire (Young et Jaffe, 1976). Après l'ovulation, la progestérone synthétisée par le corps jaune inhibe l'axe hypothalamo-hypophysaire.



Figure 19 : L'axe gonadrotrope.

(A) Fonctionnement de l'axe gonadotrope (Herbison, 2016) et (B) variation des concentrations sériques en gonadotrophines et en œstradiol au cours du cycle menstruel/oestrien en fonction de la pulsatilité des neurones à GnRH (Maggi *et al.*, 2016).

ii. Saisonnalité de l'axe gonadotrope

Chez les espèces saisonnières, l'activité de l'axe gonadotrope varie au cours de l'année avec une inhibition complète en hiver chez les reproducteurs de jours longs et, au contraire, une inhibition estivale chez les reproducteurs de jours courts.

Par exemple, les hamsters syriens et djungariens présentent une diminution marquée de la sécrétion de GnRH et de FSH à l'origine d'une régression considérable des gonades en photopériode courte (Yellon et Goldman, 1987 ; Goldman et Brown, 1979 ; Schlatt *et al.*, 1995 ; Turek *et al.*, 1975). Chez les hamsters mâles, la taille des testicules et des vésicules séminales est significativement réduite, la spermatogénèse est inhibée et la morphologie des cellules de Leydig et de Sertoli est altérée (Hikim *et al.*, 1989 ; Bergmann *et al.*, 1987). Par conséquent, les concentrations intra-testiculaires et circulantes de testostérone sont drastiquement réduites (Powers *et al.*, 1989 ; Feoktistova *et al.*, 2010). Chez le hamster djungarien femelle, l'utérus s'atrophie et l'ovaire devient dysfonctionnel, avec une intensification de la dégénérescence/atrésie des follicules, conduisant à une cessation de l'ovulation et à l'arrêt du cycle oestrien (Schiatt *et al.*, 1993 ; Moffatt-Blue *et al.*, 2006). Les concentrations plasmatiques d'œstradiol sont réduites, mais les niveaux de progestérone circulante restent stables en photopériode courte (Moffatt-Blue *et al.*, 2006).

iii. Régulation saisonnière de l'activité des neurones à GnRH

Chez les espèces à reproduction saisonnière, le nombre de neurones à GnRH ne varie pas en fonction de la photopériode (Urbanski *et al.*, 1991) suggérant une régulation saisonnière indirecte de l'axe gonadotrope. Dans les années 1970, des études réalisées sur la brebis et les hamsters avaient suggéré que la photopériode régule l'activité des neurones à GnRH en modulant la sensibilité de l'axe gonadotrope aux rétrocontrôles des stéroïdes sexuels. Par exemple, chez la brebis, l'œstradiol est un puissant inhibiteur de la sécrétion des gonadotrophines en photopériode longue alors que l'hormone n'induit pas un tel effet en photopériode courte (Turek et Campbell, 1979). Cependant, les neurones à GnRH n'expriment pas de récepteurs aux œstrogènes α (ER α) et que peu d'ER β (Herbison *et al.*, 1993 ; Hrabovsky *et al.*, 2000 ; Cheong *et al.*, 2014). Dans leur ensemble, ces observations suggèrent que les neurones à GnRH ne constituent pas la cible directe du signal photopériodique conduisant à la saisonnalité de la reproduction.

Des études ultra-structurales ont montré que le nombre d'entrées synaptiques à la membrane des neurones à GnRH doublaient lors de la saison de reproduction des brebis (Xiong *et al.*, 1997 ; Jansen *et al.*, 2003). Une autre étude chez la brebis a montré que les dendrites des neurones à GnRH sont contactées par plus de synapses glutamatergiques et moins de synapses GABAergiques en saison de

reproduction comparé à la saison d'anoestrus (Sergeeva et Jansen, 2009; Robinson, 1995). Il en résulte un changement saisonnier majeur dans l'équilibre excitation-inhibition des afférences synaptiques des neurones à GnRH. Ces données suggèrent qu'une plasticité saisonnière des afférences des neurones à GnRH participerait à la régulation photopériodique de l'axe gonadotrope.

Plasticité neuro-gliale

Les corps cellulaires et les dendrites des neurones à GnRH sont entourés de cellules gliales astrocytaires, et les dendrons projetant dans l'éminence médiane sont entourés par les pieds tanycytaires (figure 19A). Plusieurs études ont démontré que cette plasticité astrogliale/tanycytaire participe aux changements d'excitabilité et de capacité sécrétrice des neurones à GnRH (Garcia-Segura et al., 2008 ; Witkin et al., 1991). Chez les femelles, cette interaction neuro-gliale est sensible à l'œstradiol qui induit une rétraction des pieds tanycytaires entourant les terminaisons des neurones à GnRH pour faciliter la libération de GnRH dans les vaisseaux sanguins du système porte (Prévot et al., 1999 ; 2010). Des études ont également rapporté des variations saisonnières de cette plasticité neuro-gliale. Des analyses immuno-électro-microscopiques montrent que, chez des cailles exposées à une photopériode courte inhibitrice, les tanycytes forment une barrière entre les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH et la jonction neuro-hémale, ce qui pourrait participer à la diminution de la libération de GnRH dans le système sanguin (Yamamura et al., 2004). En 2011, Bolborea et coll. rapportent chez des hamsters djungariens que l'exposition à une photopériode courte inhibitrice diminue l'expression de la vimentine, un marqueur morphologique des tanycytes, et des marqueurs de plasticité (des molécules d'adhésion cellulaire connues pour participer aux phénomènes de plasticité neuronale et neurogliale) (figure 19B). Ces observations indiquent une plasticité saisonnière des tanycytes qui pourrait participer à la régulation de la libération de la GnRH. De plus, l'étude de Bolborea et coll. (2011) démontre que cette plasticité tanycytaire dépend des variations photopériodiques de la mélatonine et non de celles des stéroïdes sexuels. Les auteurs suggèrent que la mélatonine n'agit pas directement sur les tanycytes qui n'expriment pas les récepteurs MT1 mais plutôt par l'intermédiaire de l'activation des TSH-R tanycytaires par la TSH tubéralienne (Morgan et al., 1994 ; Masson-Pévet et al., 1994) ou de façon autocrine par la modulation de la T3 produite par les tanycytes.



Figure 20 : Le rôle des tanycytes.

(A) Organisation des pieds des tanycytes entourant les dendrons à GnRH dans l'éminence médiane
(Prévot *et al.*, 2010) et (B) variation photopériodique des marqueurs de morphologie (vimentine) et de plasticité (NCAM) des tanycytes (Bolborea *et al.*, 2011) chez le hamster djungarien.
PL = photopériode longue ; PC = photopériode courte.

• Neurotransmetteurs

La dopamine pourrait jouer un rôle important dans la régulation saisonnière de l'activité des neurones à GnRH chez la brebis. En effet, des lésions du noyau A15 de l'aire rétrochiasmatique contenant des neurones dopaminergiques empêchent le rétrocontrôle négatif des œstrogènes lors de l'anoestrus tandis que sa stimulation module la décharge pulsatile de la GnRH et de la LH (Meyer et Goodman, 1985 ; Curlewis *et al.*, 1991 ; Thiéry *et al.*, 1989, Lehman *et al.*, 1996). Cependant, comme les neurones à GnRH, les cellules dopaminergiques du noyau A15 n'expriment pas les ER α et leurs effets sur les neurones à GnRH sont probablement médiés par d'autres neurotransmetteurs (Lehman et Karsch, 1993, Goodman *et al.*, 2010). De plus, ces neurones ne semblent pas impliqués dans la régulation saisonnière de l'axe gonadotrope des hamsters (Weems *et al.*, 2015).

• Neuropeptides (Arg)(Phe)-amides

La découverte dans les années 2000 que deux neuropeptides de la famille des (Arg)(Phe)-amides (RF-amides), la kisspeptine (Xie *et al.*, 2022 pour revue) et le RFRP-3 (Hu *et al.*, 2019 pour revue), régulent les neurones à GnRH et la sécrétion des gonadotrophines a porté l'attention sur ces candidats pour élucider les mécanismes de la régulation saisonnière de l'axe gonadotrope.

• Kisspeptine

Au début des années 2000, le rôle critique de la kisspeptine dans la fonction de reproduction a été mis en évidence par l'observation que des mutations sur le gène codant son récepteur, GPR54 (*G*-*protein coupled 54*, aujourd'hui nommé Kiss1R), induisaient un hypogonadisme hypogonadotropique chez l'humain et que des souris KO pour *gpr54* ne présentaient pas de puberté et étaient infertiles à l'âge adulte (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Plus tard, il a été montré que les souris KO pour *Kiss1*, le gène codant pour le pré-peptide, présentent également une absence de puberté et une infertilité adulte (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007).

Les neurones kisspeptinergiques sont localisés dans deux structures hypothalamiques : le noyau périventriculaire antéroventral (AVPV) (chez les rongeurs) ou l'aire préoptique (chez les autres mammifères) et le noyau arqué (ARC) situé dans l'hypothalamus médiobasal. Les deux populations neuronales projettent leurs terminaisons nerveuses vers les aires préoptiques (Yeo *et al.*, 2016) et les neurones à kisspeptine de l'ARC présentent des appositions axones-dendrons avec les neurones à GnRH dans l'éminence médiane (Smith *et al.*, 2011).

La plupart des neurones à GnRH expriment le GPR54 et sont activés à de faibles concentrations de kisspeptine (<1 nM) (Irwig *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2008). Chez toutes les espèces de mammifères étudiées jusqu'aujourd'hui, la kisspeptine est un puissant stimulateur des neurones à GnRH. Des administrations de kisspeptine ou des activations optogénétiques des neurones à kisspeptine stimulent la sécrétion de GnRH et de gonadotrophines et la production d'hormones sexuelles chez la souris (Gottsch *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2015), le rat (Irwig *et al.*, 2005 ; Kinoshita *et al.*, 2005) et le singe (Plant *et al.*, 2006). De plus, les neurones à kisspeptine sont le principal site où les stéroïdes sexuels exercent leur rétroaction centrale.

En effet, l'expression de la kisspeptine est inhibée dans l'ARC par une action directe des œstrogènes et de la testostérone et activée dans l'AVPV (ou l'aire préoptique) des femelles par les œstrogènes (Smith *et al.*, 2005, 2007 ; Adachi *et al.*, 2007). Il est à ce jour bien établi que les neurones à kisspeptine de l'ARC forment le générateur de l'activité pulsatile des neurones à GnRH qui sont soumis à un rétrocontrôle inhibiteur des stéroïdes sexuels, chez les mâles et les femelles (Lehman *et al.*, 2010). D'autre part, les neurones à kisspeptine de l'AVPV/aire préoptique, qui sont soumis au rétrocontrôle activateur des estrogènes, participent à l'induction du pic pré-ovulatoire de LH chez les femelles (Adachi *et al.*, 2007).

Des variations photopériodiques marquées de l'expression de la kisspeptine dans l'ARC ou l'AVPV ont été rapportées chez de nombreuses espèces saisonnières (Simonneaux, 2020 pour revue). Cependant, des niveaux élevés de kisspeptine ne coïncident pas forcément avec la saison de reproduction puisque les hamsters djungariens et européens présentent des expressions augmentées de kisspeptine en photopériode inhibitrice courte (Greives *et al.*, 2008 ; Saenz de Miera *et al.*, 2014).

Des expériences de pinéalectomie en photopériode courte et d'administration de mélatonine en photopériode longue ont été réalisées pour étudier la relation fonctionnelle entre le message mélatoninergique saisonnier et la kisspeptine hypothalamique. Chez le hamster syrien, la pinéalectomie empêche la réduction de l'expression de la kisspeptine par les neurones de l'ARC, induite par les jours courts, tandis que l'administration de mélatonine en fin de jours longs diminue l'expression de la kisspeptine dans les neurones de l'ARC (Revel *et al.*, 2006, figure 20A ; Ansel *et al.*, 2010). L'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'expression de la kisspeptine de l'ARC a aussi été rapporté chez le hamster turc (Piekarski *et al.*, 2014) et le rat (de Oliveira *et al.*, 2018). Chez les reproducteurs de jours courts comme le mouton (Lomet *et al.*, 2020) ou le dromadaire (Ainani *et al.*, 2022), l'expression de la kisspeptine de l'ARC est inhibée en photopériode longue et chez le mouton, cette inhibition est dépendante des stéroïdes sexuels (Lomet *et al.*, 2020).

Les MT1 ne sont pas exprimés par les neurones à kisspeptine de l'ARC des moutons (Li *et al.*, 2011) suggérant que la mélatonine agit indirectement sur les neurones à kisspeptine. Nous avons vu précédemment que la mélatonine agit préférentiellement sur ses récepteurs MT1 massivement concentrés dans la *pars tuberalis* pour moduler la voie de signalisation rétrograde TSH/DIO2/T3 qui joue un rôle critique dans la régulation saisonnière de la fonction de reproduction (Barrett *et al.*, 2007 ; Murphy *et al.*, 2012). Des études réalisées, notamment dans notre équipe, ont mis en évidence une relation fonctionnelle entre la voie TSH/DIO2/T3 et l'expression saisonnière de la kisspeptine de l'ARC. En effet, des infusions centrales de TSH et de T3 restaurent l'expression de kisspeptine dans les neurones de l'ARC et l'activité gonadique de hamsters syriens et djungariens adaptés à une photopériode courte inhibitrice (Klosen *et al.*, 2013 ; Henson *et al.*, 2013). Les mécanismes par lesquels la T3 régule l'expression saisonnière de la kisspeptine de la kisspeptine de la kisspeptine des neurones de l'ARC restent encore à déterminer. Dufourny et coll., en 2016, ont rapporté que les neurones à kisspeptine dans des explants hypothalamiques n'est pas modifiée par divers traitements à la T3, suggérant un effet indirect de la T3 sur la régulation saisonnière de kisspeptine dans l'ARC.

L'existence de variations d'expression de kisspeptine de l'ARC, dépendante de la mélatonine, suggérait un rôle de ce peptide dans la reproduction saisonnière. Cette hypothèse a été confirmée par de multiples études réalisant des infusions chroniques de kisspeptine chez des mammifères maintenus en photopériode inhibitrice de l'axe gonadotrope. Ainsi, l'infusion intracérébroventriculaire ou périphérique de kisspeptine est capable de restaurer l'activité de reproduction chez le hamster syrien mâle (figure 20B) (Ansel *et al.*, 2010 ; Revel *et al.*, 2006) et femelle (Henningsen *et al.*, 2017 chez le hamster djungarien mâle et femelle (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019) et chez la brebis (Caraty *et al.*, 2007).



Figure 21 : Expériences de Revel et al., en 2006.

Ces expériences démontrent chez le hamster syrien que (A) la pinéalectomie empêche la réduction de l'expression de la kisspeptine par les neurones de l'ARC, induite par la photopériode courte (PC), et (B) l'infusion centrale de kisspeptine (Kp10) restaure l'activité de reproduction inhibée par la PC. aCSF = liquide cérébrospinal artificiel ; PL = photopériode longue.

Finalement, les neurones à kisspeptine de l'ARC forment une interface essentielle à la régulation saisonnière de la reproduction, intégrant les signaux thyroïdiens dépendants de la mélatonine et le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels.

o RFRP-3

Un second neuropeptide de la famille des RF-amides a été étudié pour son activité régulatrice des neurones à GnRH et, par conséquent, son potentiel rôle modulateur de la reproduction saisonnière.

Ce peptide a été découvert en 2000 chez la caille et a été rapporté comme le premier régulateur hypothalamique capable d'avoir une activité, à l'époque inédite, d'inhibition des gonadotrophines hypophysaires, ce qui lui a valu le nom de *gonadotropin-inhibitory hormone* (GnIH) (Tsutsui *et al.*, 2000). Son orthologue chez les mammifères est nommé *RF-related peptide-3* (RFRP-3) qui est l'un des deux peptides fonctionnels produits à partir du pré-propeptide codé par le gène *Rfrp* (aussi appelé *Npvf*) (Kriegsfield *et al.*, 2006, Ubuka *et al.*, 2012).

Les neurones à RFRP-3 sont localisés dans l'hypothalamus dorso- et ventro-médian et projettent vers de multiples régions intra et extra-hypothalamiques, dont l'aire pré-optique contenant les neurones à GnRH (Angelopoulou *et al.*, 2019 pour revue). Environ le tiers des neurones à GnRH forment des contacts proches avec les terminaisons des neurones à RFRP-3 et expriment le récepteur spécifique au RFRP-3 appelé GPR147 ou NPFFR1 (Ubuka *et al.*, 2012 ; Rizwan *et al.*, 2012). Le RFRP3 a des effets majoritairement inhibiteurs sur les neurones à GnRH, mais il est aussi capable de stimuler l'activité

électrique de 12% des neurones à GnRH sur des tranches hypothalamiques de souris (Ducret *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Chez la souris, les neurones à RFRP-3 contactent également 10% des neurones à kisspeptine de l'AVPV et 25% des neurones à kisspeptine de l'ARC exprimant GPR147 (Rizwan *et al.*, 2012; Poling *et al.*, 2013). Ses caractéristiques neuroanatomiques et fonctionnelles supposent un rôle du RFRP-3 dans la régulation de l'axe gonadotrope, pourtant son action précise dans la fonction de reproduction est encore très discutée. En effet, des souris KO pour GPR147 présentent un phénotype reproducteur très peu perturbé (Leon *et al.*, 2014).

De plus, des études rapportent que les effets du RFRP-3 sur l'axe gonadotrope présentent des différences notables dépendantes des espèces, du sexe, du moment du cycle oestrien et des conditions environnementales (Angelopoulou *et al.*, 2019; Dardente et Simonneaux, 2022 pour revues). Néanmoins, plusieurs études s'accordent pour attribuer un rôle inhibiteur du RFRP-3 sur la sécrétion élevée de LH lors du pic pré-ovulatoire chez les rongeurs femelles (Henningsen *et al.*, 2017; Ancel *et al.*, 2017).

Chez de nombreuses espèces, incluant des reproducteurs de jours longs comme les hamsters (Revel *et al.*, 2008 ; Mason *et al.*, 2010 ; Piekarski *et al.*, 2014, Saenz de Miera *et al.*, 2014), les gerboises (Talbi *et al.*, 2016), les souris proficientes en mélatonine (Saenz de Miera *et al.*, 2020) mais aussi des reproducteurs de jours courts comme les moutons (Smith *et al.*, 2008), les chèvres (Jafarzadeh Shirazi *et al.*, 2014), les opossums (Harbid *et al.*, 2013) et les dromadaires (Ainani *et al.*, 2020) l'expression de RFRP-3 est toujours plus élevée en photopériode longue par rapport à la photopériode courte et, ceci, sans distinction de sexe (figure 21). L'expression du récepteur au RFRP-3 chez le hamster syrien (Henningsen *et al.*, 2016) ainsi que le nombre de terminaisons nerveuses à RFRP-3 innervant les neurones à GnRH chez le hamster djungarien (Ubuka *et al.*, 2012) et le mouton (Smith *et al.*, 2008) sont également réduits en photopériode courte.



Figure 22 : Variations photopériodiques de RFRP-3 dans l'hypothalamus de reproducteurs de jours longs et de jours courts (Angelopoulou *et al.*, **2019).** PL = photopériode longue ; PC = photopériode courte.

Chez les rongeurs, la régulation de l'expression saisonnière des neurones à RFRP-3 est indépendante du rétrocontrôle des stéroïdes sexuels. En effet, la gonadectomie en photopériode longue ou la supplémentation en stéroïdes sexuels en photopériode courte n'affecte pas l'expression des neurones à RFRP-3 du hamster syrien mâle (Revel *et al.*, 2008) ou femelle (Henningsen *et al.*, 2017) et du hamster djungarien mâle (Rasri-Klosen *et al.*, 2017).

Les premières investigations sur le rôle de la mélatonine dans la régulation saisonnière de l'expression du RFRP-3/GnIH ont été menées chez les cailles (Ubuka *et al.*, 2005). Ces travaux ont rapporté un effet stimulateur de la mélatonine par une action directe sur ses récepteurs Mel1C présents sur les neurones à GnIH. Chez les hamsters syriens (Revel *et al.*, 2008), djungariens (Ubuka *et al.*, 2012)

et turcs (Piekarksi *et al.*, 2014) le nombre de neurones à RFRP-3 est réduit par l'administration de mélatonine en photopériode longue et augmenté suite à la pinéalectomie en photopériode courte.

L'existence d'un lien fonctionnel entre la voie TSH/T3 dépendante de la mélatonine et la régulation saisonnière du RFRP-3 a été testée en analysant les effets d'une infusion chronique centrale de TSH. La TSH administrée chez des hamsters syriens et djungariens mâles maintenus en photopériode inhibitrice courte restaure complètement l'expression de RFRP3 (Klosen *et al.*, 2013). Les mêmes résultats ont été trouvés chez le hamster djungarien mâle injecté avec de la T3 en photopériode courte (Henson *et al.*, 2013). Chez la brebis, la thyroïdectomie abolit les variations saisonnières d'expression de RFRP-3 (Lomet *et al.*, 2018) bien que ce neuropeptide ne semble pas induire d'effet sur l'axe reproducteur de cette espèce (Decourt *et al.*, 2016). Des travaux récents de notre équipe suggèrent que l'effet de la T3 sur les neurones à RFRP-3 dépend des TR α puisque l'inhibition de l'expression de RFRP-3 par l'administration orale de mélatonine est abolie chez des souris avec des TR α non fonctionnels, cet effet serait indirect probablement *via* des cibles non-neuronales (Quignon *et al.*, 2020).

Le rôle du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de la reproduction a été investigué par des expériences d'infusions ou d'injections de RFRP-3 en conditions photopériodiques variables. Chez des hamsters syriens mâles et femelles, maintenus en photopériode inhibitrice courte, des injections chroniques de RFRP-3 restaurent l'activité des neurones à GnRH, l'expression des neurones à kisspeptine de l'ARC, la sécrétion des gonadotrophines et la production des stéroïdes sexuels (Ancel *et al.*, 2012 ; Henningsen *et al.*, 2017). Chez le hamster djungarien, l'administration aiguë de RFRP-3 stimule la sécrétion de LH chez des animaux maintenus en photopériode courte et l'inhibe chez des animaux maintenus en photopériode longue (Ubuka *et al.*, 2012) Cependant des infusions chroniques de RFRP-3 chez le hamster djungarien mâle ou femelle gardé en photopériode courte inhibitrice ne restaurent pas l'activité de l'axe reproducteur (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019).

L'expression de RFRP-3 présente des variations saisonnières marquées et très conservées chez tous les mammifères étudiés à ce jour, quelle que soit leur physiologie reproductive et cette régulation dépend indirectement de la mélatonine et pas du rétrocontrôle des stéroïdes sexuels. Les études chez le hamster syrien montrent un rôle du RFRP-3 relativement clair dans l'activation de l'axe gonadotrope en photopériode longue mais, chez la brebis et le hamster djungarien, aucun des protocoles d'administration du RFRP-3 n'a pu montrer d'effet significatif sur l'activité de reproduction. Il n'est pas exclu que le RFRP-3 puisse agir de concert avec l'action de la kisspeptine dans l'ARC puisque des contacts proches existent entre ces deux populations neuronales et que des injections de RFRP-3 restaurent l'expression de kisspeptine dans l'ARC (Ancel *et al.*, 2012 : Henningsen *et al.*, 2017).

b. Les régulateurs saisonniers du métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est stratégiquement modulé par les variations saisonnières de l'environnement de sorte que les phases de croissance, dites d'anabolisme, aient lieu lorsque la nourriture est abondante, c'est-à-dire en photopériode longue et que les phases de catabolisme s'opèrent lorsque la nourriture se fait plus rare en photopériode courte (Lincoln *et al.*, 2002). Plusieurs études rapportent des effets de la photopériode sur l'adiposité, la prise alimentaire et la dépense énergétique par le tissu adipeux brun. D'autres tissus métaboliques comme le foie et les muscles présentent aussi des régulations photopériodiques mais sont relativement peu documentées (Navarro-Masip *et al.*, 2023).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent les changements saisonniers du métabolisme énergétique ont principalement été étudiés chez des modèles de rongeurs saisonniers tels que le hamster djungarien et le rat Fisher 344 (Navarro-Masip *et al.*, 2023). Les rongeurs saisonniers ont attiré l'attention du champ de recherche sur l'obésité car ils représentent des modèles intéressants pour étudier les mécanismes de régulation physiologique du poids corporel (Suleiman *et al.*, 2020). Dans le contexte des rythmes saisonniers métaboliques, plusieurs études ont démontré que la production de T3 hypothalamique en photopériode longue favorise un état anabolique avec une augmentation de la prise alimentaire, du poids corporel et une diminution de la dépense énergétique alors que sa conversion en rT3 ou T2 inactives en photopériode courte favorise un état inverse catabolique (Barrett *et al.*, 2007 ; Murphy *et al.*, 2012).

i. Métabolisme du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est composé de divers types cellulaires incluant une majorité d'adipocytes. Ce tissu se développe selon un processus complexe de différenciation cellulaire appelé adipogenèse et se distribue dans diverses régions du corps sous formes de dépôts sous-cutanés et viscéraux. Les adipocytes sont spécialisés dans le stockage des lipides sous forme de triglycérides et leur métabolisme est déterminant dans la balance énergétique d'un organisme (Morigny *et al.*, 2021 pour revue). D'une part, deux processus cellulaires nommés lipogenèse et lipogenèse *de novo* permettent l'absorption des acides gras et du glucose et leur transformation et accumulation en triglycérides, constituant une réserve énergétique majeure pour l'organisme. Ces deux processus cellulaires sont stimulés par la présence d'insuline et/ou la prise alimentaire et inhibés par l'hormone de croissance (Ali *et al.*, 2013 pour revue). D'autre part, les adipocytes sont capables de dégrader les triglycérides en acides gras et en glycérol sous l'action de multiples enzymes de la famille des lipases. Ce processus est appelé lipolyse et permet de libérer de l'énergie grâce au métabolisme consécutif des acides gras générateur d'adénosine-triphosphate (ATP, β -oxydation, cycle de Krebs). La lipolyse est influencée par de nombreux facteurs : elle est particulièrement stimulée par le jeun, l'exercice physique, l'exposition au froid et l'hormone de croissance et est inhibée par une diminution de la concentration plasmatique

d'insuline et la prise alimentaire (Richard *et al.*, 2020 ; Navarro-Masip *et al.*, 2023 pour revues). En plus de constituer un réservoir énergétique, le tissu adipeux blanc est également un organe endocrinien actif capable de produire et sécréter des adipocytokines, un groupe de molécules et d'hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. La leptine est l'une de ces adipocytokines et ses niveaux sont liés à l'état nutritionnel et au stockage de l'énergie. Par conséquent, la leptine informe l'hypothalamus du niveau des réserves énergétiques, ce qui permet de déclencher des réponses qui régulent le poids corporel et l'homéostasie énergétique (Martinez-Sanchez, 2020 pour revue).

En photopériode courte, les processus d'adipogénèse sont diminués chez le rat F344 et le rat psamommys obèse, la lipogenèse est réduite chez le rat F344 et le campagnol de Brandt et la lipolyse augmente chez le hamster djungarien, ces processus conduisant à une réduction de l'adiposité (Gibert-Ramos et al., 2019; Ryu et al., 2018, Liu et al., 2016; Tan et al., 2019). Des études rapportent aussi des phénomènes de brunissement (browning/beiging) du tissu adipeux blanc en fonction de la photopériode avec des variations contradictoires parmi les espèces. Le brunissement du tissu adipeux blanc confère aux adipocytes blancs un phénotype d'adipocytes bruns dont la principale caractéristique est la production de chaleur (détaillé plus loin). Le hamster djungarien présente une augmentation du brunissement du tissu adipeux blanc en photopériode courte qui est dépendante de la mélatonine (Ryu et al., 2018). A l'inverse, des marqueurs moléculaires du brunissement sont diminués chez des rats psammomys obèses maintenus en photopériode courte (Tan et al., 2019). De la même façon, chez les rats F344 et les campagnols de Brandt, exposés à une photopériode longue, le brunissement du tissu adipeux blanc augmente (Gibert-Ramos et al., 2019; Liu et al., 2016). Chez le hamster djungarien, l'expression de la leptine dans le tissu adipeux et sa concentration circulante sont directement corrélées au degré d'adiposité. En photopériode courte, les hamsters présentent des niveaux de leptine réduits dans la graisse et le plasma (Klingenspor et al., 1996, 2000 ; Atcha et al., 2000 ; Rousseau et al., 2002).

ii. Prise alimentaire

La prise alimentaire est régulée par des neurones hypothalamiques de l'ARC qui intègrent les changements d'une part des apports nutritifs acheminés par plusieurs hormones métaboliques incluant la leptine, l'insuline, la ghréline et la cholécystokinine et d'autre part des dépenses énergétiques (Vohra *et al.*, 2022 pour revue). L'ARC représente la structure d'intégration de premier ordre qui convoie les informations de satiété/faim vers d'autres noyaux hypothalamiques (noyau paraventriculaire : PVN, noyau ventromédian : VMN, noyau dorsomédian : DMN, hypothalamus latéral) et extra-hypothalamiques (noyau parabranchial : PB) de second ordre dont la sécrétion de neurotransmetteurs spécifiques permet de réguler le comportement de prise alimentaire (Myers Jr et Olson, 2012 pour revue).

Brièvement, quand la balance énergétique de l'organisme est positive, les concentrations circulantes de leptine, d'insuline et de cholécystokinine augmentent et activent des neurones de l'ARC exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC) ce qui induit l'expression de molécules anorexigéniques (incluant notamment le régulateur à la transcription de cocaïne et d'amphétamines : CART, l'hormone mélanotrope : α -MSH et des orexines) qui agissent sur des neurones de second ordre dans le PVN et le VMN pour favoriser la réduction de la prise alimentaire. Quand l'organisme présente une balance énergétique négative, les concentrations circulantes de ghréline augmentent alors que celles de leptine diminuent. Ces variations hormonales activent les neurones de l'ARC exprimant l'agouti-related protein (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY). Ces neurones orexigéniques exercent un tonus inhibiteur sur les neurones à POMC et stimulent la prise alimentaire par des neurones de second ordre présents dans le PVN, l'hypothalamus latéral et le DMN, tout en inhibant l'activité des neurones anorexigéniques du VMN et du PB. Les connexions exactes du circuit hypothalamique qui participent à la régulation de la prise alimentaire ne sont pas encore totalement comprises (Navarro-Masip *et al.*, 2023 pour revue, figure 22).



Figure 23 : Schéma simplifié du contrôle hypothalamique de la prise alimentaire.

L'ARC est la structure de premier ordre qui intègre les signaux endocriniens et convoient les informations de satiété/faim vers d'autres noyaux hypothalamiques et extra-hypothalamiques de second ordre dont l'activité régule le comportement alimentaire. Modifié à partir de Navarro-Masip *et al.*, 2023. LH = hypothalamus latéral.

La prise alimentaire peut être influencée par les saisons, notamment chez les hamsters djungariens et les rats F344 qui diminuent leur prise alimentaire en photopériode courte (Reddy et al., 1999; Togo et al., 2012; Ross et al., 2015). Chez le hamster djungarien, maintenu en photopériode longue, la concentration plasmatique de leptine est augmentée malgré une prise alimentaire stable (Mercer et al., 2001) suggérant un phénomène d'insensibilité à la leptine en photopériode longue qui s'atténuerait en photopériode courte (Morgan et al., 2006). Cette hypothèse a été confirmée par des expériences démontrant que des injections de leptine agissent plus efficacement en photopériode courte qu'en photopériode longue pour diminuer la prise alimentaire et le poids corporel (Klingenspor et al., 2000 ; Reddy et al., 1999). Le système de régulation de la prise alimentaire dans l'ARC du hamster djungarien présente des variations saisonnières mais qui sont soit non reproductibles entre laboratoires, soit paradoxales en regard de leur état énergétique. En effet, Mercer et coll. (2001) ont montré que la quantité du neuropeptide anorexigène CART varie de manière prédictive, avec une augmentation en photopériode courte mais Rousseau et coll. (2002) ont montré que l'expression de ce gène, par hybridation in situ, ne présente pas de variation photopériodique significative. Chez le hamster djungarien, les expressions de NPY, d'orexine et d'AgRP ne varient pas avec la photopériode (Reddy et al., 1999; Rousseau et al., 2002) et celle de POMC varie de façon opposée à celle attendue dans une situation de déficit énergétique, puisqu'elle diminue en photopériode courte (Reddy et al., 1999; Mercer et al., 2000, 2001 ; Rousseau et al., 2002 ; Bao et al., 2019). De façon intéressante, l'injection de T3 chez des hamsters exposés à une photopériode courte augmente l'expression hypothalamique de POMC (Bao et al., 2019). Des analyses in silico de la séquence promotrice du gène codant pour POMC ont identifié deux sites de liaison du récepteur thyroïdien β suggérant que la T3 pourrait réguler directement la transcription de *pomc* (Bao *et al.*, 2019). Une interprétation possible de la régulation paradoxale de POMC est que les variations saisonnières de l'appétit reflètent des changements de comportement alimentaire programmés à long terme plutôt que des réponses réactives à des changements de disponibilité alimentaire. Dans ce contexte, POMC pourrait réguler la prise alimentaire saisonnière selon des mécanismes différents du système hypothalamique classique impliqué dans le contrôle à court-terme de la prise alimentaire (Bao et al., 2019).

Des études réalisées chez le rat F344 suggèrent que la saisonnalité pourrait également influencer le type de nutriments ingérés. En effet, des rats maintenus en photopériode courte consomment moins d'énergie issue des protéines et des carbohydrates que les rats maintenus en photopériode longue mais conservent la même prise d'énergie lipidique entre les deux types de photopériode (Ross *et al.*, 2015, Mariné-Casado *et al.*, 2018).

iii. Dépense énergétique et tissu adipeux brun

Chez les rongeurs, la dépense énergétique peut impliquer l'activité du tissu adipeux brun. Ce tissu a des propriétés morphologiques et fonctionnelles différentes du tissu adipeux blanc car il ne permet pas de stocker de l'énergie mais, au contraire, de la dissiper sous forme de chaleur, par un phénomène intracellulaire appelé thermogénèse (sans frisson) (Townsend et Tseng, 2012 pour revue). La thermogénèse met en jeu l'action de la protéine découplante UCP-1, localisée à la membrane mitochondriale des adipocytes bruns, qui dissocie le fonctionnement de la chaîne respiratoire avec la synthèse d'ATP, libérant l'énergie sous forme de chaleur.

Chez plusieurs espèces saisonnières, la masse du tissu adipeux brun présente des variations photopériodiques. De plus, des marqueurs fonctionnels du tissu adipeux brun, incluant l'expression d'UCP-1, sont augmentés chez des hamsters djungariens et syriens exposés à une photopériode courte (Demas *et al.*, 2002, Bartness et Wade, 1984). Il a été montré, chez le hamster djungarien, que cet effet est régulé par la mélatonine (Ryu *et al.*, 2018). Chez le rat F344, des expériences de calorimétrie indirecte démontrent que l'exposition en photopériode courte induit aussi une augmentation de la dépense énergétique (Ibars *et al.*, 2018) mais qui serait indépendante de l'activité du tissu adipeux brun (Gibert-Ramos *et al.*, 2018).

Certaines espèces saisonnières peuvent réduire drastiquement leur dépense énergétique en réduisant leur température corporelle pour quelques heures par jour (torpeur journalière) ou plusieurs jours/semaines (hibernation). Les hamsters djungariens adaptés à la photopériode courte présentent des torpeurs journalières (Heldmaier et Steinlechner, 1981). En effet, pendant leur période de repos diurne, leur métabolisme de base est réduit de 75% et leur température corporelle descend aux alentours de 15°C pendant plusieurs heures, ce qui leur permet de réduire leur dépense énergétique tout en maintenant les activités sociales et de recherche de nourriture en période nocturne. Les régulateurs centraux de ce phénomène saisonnier restent encore à définir. Cependant, plusieurs études ont suggéré que les hormones thyroïdiennes hypothalamiques sont impliquées dans le contrôle saisonnier des torpeurs journalières du hamster djungarien (Murphy *et al.*, 2012 ; Bank *et al.*, 2017).

iv. Cycles de croissance

Des auteurs proposent que les changements de poids corporel observés lors des transitions saisonnières, incluant notamment une réduction de la masse squelettique et des organes internes (reins, foie, glandes surrénaliennes, tissus adipeux blanc et brun) en hiver, pourraient être conceptuellement considérés comme des changements saisonniers de la croissance (Dumbell *et al.*, 2015). Ainsi, l'axe somatotrope régissant les effets anabolisants de l'hormone de croissance pourrait jouer un rôle dans la régulation du poids corporel des mammifères saisonniers.

La sécrétion de l'hormone de croissance par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse est modulée par des effecteurs hypothalamiques positifs (l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GH-RH) et la TRH) et négatif (somatostatine, SST). L'hormone de croissance circulante peut directement agir sur de multiples tissus cibles pour induire la synthèse protéique, la glycogénolyse et la lipolyse ou indirectement par le biais de l'insulin-like growth factor (IGF-1) hépatique. Plusieurs études rapportent une augmentation de l'expression de la somatostatine dans l'ARC de hamsters djungariens exposés à une photopériode courte (Herwig et al., 2012, 2013; Petri et al., 2014). Il a été proposé que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans la régulation photopériodique de la somatostatine puisque l'infusion centrale de TSH, chez des hamsters djungariens exposés à une photopériode courte inhibitrice, diminue l'expression de somatostatine dans l'ARC et augmente le poids corporel (Klosen et al., 2013). De plus, l'administration d'une molécule analogue de la somatostatine, le pasiréotide, chez des hamsters djungariens maintenus en photopériode longue, induit un phénotype métabolique proche du phénotype de hamsters exposés à une photopériode courte (perte de poids corporel graduelle, réduction de la masse des organes internes) tandis que l'administration de l'hormone de croissance à des hamsters maintenus en photopériode courte restaure un poids corporel de type photopériode longue (Dumbell et al., 2015).

v. Les tanycytes : médiateurs de l'homéostasie énergétique

La position privilégiée des tanycytes, au cœur de l'intégration du message photopériodique convoyé par le signal de la TSH sur ses récepteurs tanycytaires et en première ligne de la réception des messages nutritionnels, en fait un type cellulaire pertinent à investiguer dans le contexte de la régulation saisonnière du métabolisme énergétique.

En fonction de l'état nutritionnel, les tanycytes présentent des changements morphologiques importants permettant de moduler la perméabilité hémato-encéphalique et par conséquent l'accès des substrats métaboliques à l'ARC (Langlet *et al.*, 2013). De plus, les tanycytes jouent un rôle clef dans le transport des hormones métaboliques comme la ghréline (Schaeffer *et al.*, 2013) et la leptine (Balland *et al.*, 2014) de la périphérie vers l'ARC et ce transport peut être modulé selon l'état nutritionnel (Collden *et al.*, 2015). Les tanycytes expriment aussi plusieurs transporteurs du glucose ainsi que des protéines facilitant la diffusion du lactacte, du pyruvate et des corps cétoniques (Lewis et Ebling, 2017 pour revue). L'ensemble de ces données démontre que les tanycytes jouent un rôle clef dans les mécanismes hypothalamiques d'intégration des signaux qui régulent la balance énergétique. Puisque les tanycytes présentent une variation saisonnière de leur morphologie et de leur métabolisme thyroïdien, il est probable que ces cellules soient impliquées dans la régulation des cycles saisonniers du métabolisme énergétique, une hypothèse qui reste à investiguer (figure 23).



Figure 24 : Schéma conceptuel proposant les tanycytes comme des éléments intégrateurs clefs des signaux nutritionnels et métaboliques.

Leurs capacités plastiques permettraient d'influencer la fonction des centres de contrôle hypothalamiques et, à terme, réguler la physiologie et les comportements liés notamment au métabolisme énergétique. Modifié de Travaglio et Ebling, 2019.

c. Synchronisation neuroendocrine de la saisonnalité reproduction et du métabolisme énergétique

Les mécanismes centraux régulant le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction sont généralement étudiés séparément. Pourtant, de nombreuses études montrent des interactions entre les circuits neuroendocriniens régulant ces deux fonctions et de telles interactions semblent indispensables pour coupler la reproduction aux besoins énergétiques, notamment dans le contexte de la saisonnalité. Chez l'agnelle, la restriction calorique induit une diminution de l'expression de kisspeptine et des concentrations plasmatiques de LH (Polkoswka *et al.*, 2015). Chez la brebis, les neurones à kisspeptine de l'ARC répondent à la leptine et forment des connexions avec les neurones à NPY et à POMC (Backholer *et al.*, 2010). Sur des explants hypothalamiques de souris, la kisspeptine excite directement les neurones à POMC et inhibe indirectement l'activité des neurones à NPY *via* l'activation d'interneurones GABAergiques. À l'inverse, le RFRP-3 inhibe l'activité des neurones à POMC (Fu et Van den Pol, 2010) et les terminaisons des neurones à RFRP-3 forment des contacts proches avec les neurones à NPY dont elles inhiben l'activité neuronale (Jacobi *et al.*, 2013).

Des études de notre équipe ont considéré le rôle potentiel des neurones à kisspeptine et à RFRP-3 dans la régulation du comportement alimentaire et la transmission de l'information métabolique à l'axe gonadotrope dans un contexte saisonnier. Des infusions chroniques de kisspeptine et de RFRP-3 augmentent le poids corporel de hamsters djungariens mâles maintenus en photopériode inhibitrice courte mais ne modifient pas les paramètres métaboliques des femelles (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019). La kisspeptine induit ses effets par une augmentation de l'expression de POMC et du NPY sous le contrôle de la testostérone, alors que les effets orexigéniques du RFRP-3 sont associés à une augmentation des concentrations circulantes de leptine et d'insuline, sans impact notable sur les peptides hypothalamiques régulateurs de la prise alimentaire (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019). Plusieurs études démontrent que la kisspeptine est un activateur de l'axe somatotrope, capable d'agir directement sur la sécrétion de l'hormone de croissance dans l'adénohypophyse (Whitlock *et al.*, 2010 ; Gutierriez-Pascual *et al.*, 2007 ; Kadowaka *et al.*, 2008). Cependant, l'administration de kisspeptine chez le hamster djungarien n'a pas modifié l'expression de la somatostatine dans l'ARC (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019). Il n'est pas exclu que la kisspeptine module l'action de l'hormone de croissance dans un contexte saisonnier mais son effet sur l'axe somatotrope d'espèces saisonnières reste à déterminer.

D'autres études de notre équipe ont rapporté qu'une administration aigüe de RFRP-3 exerce un effet orexigénique chez la gerboise femelle (Talbi *et al.*, 2016) et des hamsters djungariens femelles (mais pas chez des mâles) maintenues en photopériode courte et en photopériode longue (Cazarez-Marquez *et al.*, 2020). Chez les deux espèces, ces effets impliquent une augmentation de l'expression de NPY et chez le hamster djungarien, ils sont conditionnés par les concentrations circulantes d'œstradiol (Talbi *et al.*, 2016 ; Cazarez-Marquez *et al.*, 2020).

Pour conclure, les rythmes saisonniers des fonctions de reproduction et de gestion de l'énergie sont régulés par un réseau neuro-glial hypothalamique complexe dont les relations avec la voie d'intégration photopériodique TSH/Dio2/T3 ne sont pas complètement établies. L'activité saisonnière de l'axe gonadotrope, majoritairement étudiée chez le mouton et les hamsters, est régulée essentiellement par des neuropeptides RF-amides agissant en amont des neurones à GnRH sous l'effet mélatonine-dépendant de la T3 hypothalamique et la kisspeptine modulée par le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels (Dardente et Simonneaux, 2022 pour revue). Les cycles saisonniers du métabolisme énergétique, investigués majoritairement chez le hamster djungarien et le rat F344, semblent programmés à long-terme par l'intégration du message photopériodique thyroïdien au niveau de l'axe somatotrope, de l'expression de *pomc* et éventuellement la plasticité tanycytaire. Finalement, les tanycytes, par leur intégration du message mélatoninergique *via* la TSH, représentent des éléments clefs de l'hypothalamus pouvant réguler la sécrétion de GnRH et l'état nutritionnel des mammifères selon des mécanismes qui restent à explorer (figure 24).



Figure 25 : Schéma simplifié du contrôle photopériodique de la reproduction et du métabolisme énergétique.

La mélatonine agit sur la *pars tuberalis* (par l'intermédiaire du récepteur MT1) pour contrôler des voies de signalisation antérograde et rétrograde. La voie de signalisation antérograde implique l'action de tubéraline(s) (non identifiée(s)) dont la libération dans l'éminence médiane (EM) déclenche la synthèse saisonnière de la prolactine (PRL) dans la pars distalis et régule notamment les variations de couleur du pelage. La voie rétrograde nécessite la transcription de TSH, régie par un mécanisme circadien dépendant de EYA3. La TSH agit ensuite (par l'intermédiaire du TSH-R) sur les tanycytes pour réguler le métabolisme des hormones thyroïdiennes par les Dio2/Dio3 qui favorise la production de T3 pendant les jours longs.

Les mécanismes d'action en aval de la T3 sont susceptibles de comprendre (très probablement indirectement) les neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus dorsomédial (DMH) et les neurones à kisspeptine (Kp) dans l'ARC, qui à leur tour contrôlent la production de GnRH au niveau de l'EM et donc la production de LH/FSH par la pars distalis. La T3 influence directement ou indirectement les neurones à POMC et à SST de l'ARC impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. En parallèle, la plasticité morphologique et l'intégration de signaux métaboliques externes (nutriments) et endocriniens (leptine, insuline) des tanycytes pourraient participer à la régulation photopériodique de la reproduction et du métabolisme énergétique, mais leurs implications restent à être investiguées. Modifié à partir de Dardente et Simonneaux, 2022.

5. <u>Le hamster djungarien pour modéliser en laboratoire les rythmes saisonniers de la</u> reproduction et du métabolisme énergétique

Le hamster djungarien est un modèle animal très étudié pour investiguer la physiologie saisonnière. Ses capacités naturelles d'adaptation reproductrice et métabolique aux saisons ainsi que les variations saisonnières de son pelage peuvent être mimées en conditions photopériodiques contrôlées de laboratoire (Bartness et Wade, 1984 ; Goldman., 1999).

Dans la majorité des laboratoires et des études précédemment citées, les transitions saisonnières ont été modélisées en soumettant les hamsters maintenus en photopériode longue (habituellement 16 h de lumière/8 h d'obscurité) à un transfert abrupt en photopériode courte (habituellement 8 h de lumière/16 h d'obscurité) (transition hivernale) ou inversement par un transfert direct d'une photopériode courte à longue (transition estivale). Néanmoins, ces transferts photopériodiques abrupts ne reflètent pas l'environnement naturel où les hamsters sont soumis à des variations quotidiennes incrémentales de photopériode au cours de l'année. L'emploi de protocoles de changements photopériodiques naturels permet d'étudier la dynamique temporelle d'orchestration de l'expression de gènes contribuant et régulant les adaptations physiologiques aux saisons (Petri *et al.*, 2016). Cependant, ces protocoles photopériodiques naturels requièrent une longue durée expérimentale (au moins une année) et des installations logistiques particulières. Les protocoles de transitions photopériodiques abruptes induisent des changements physiologiques et neuroendocriniens marqués chez ces hamsters en l'espace de 10 à 15 semaines.

6. Les rythmes saisonniers : quelles sont les perspectives de recherche ?

La recherche sur les rythmes saisonniers est particulièrement multidisciplinaire et apporte des connaissances fondamentales en neuroendocrinologie, chronobiologie, écophysiologie, et biologie évolutive.

Au-delà de la curiosité d'explorer d'impressionnants phénomènes d'adaptations physiologiques à l'environnement, la compréhension des mécanismes influençant les fonctions biologiques saisonnières a notamment permis d'optimiser la gestion des élevages. Sur la base des connaissances actuelles, des traitements photopériodiques artificiels, des implants de mélatonine et des stratégies nutritionnelles ont été développés afin de maîtriser la reproduction saisonnière des ovins, caprins et bovins (Chemineau *et al.*, 1996 ; Fréret *et al.*, 2018). En effet, les traitements photopériodiques combinés à des administrations de mélatonine à certaines périodes de l'année permettent d'avancer la saison sexuelle et d'induire une activité de reproduction à contre-saison. Néanmoins, un récent enjeu dans la maîtrise de la reproduction des mammifères d'élevage est de développer des protocoles non hormonaux, en bâtiments ouverts, pour généraliser une agriculture durable et biologique (Pellicier-Rubio *et al.*, 2009, 2019).

Au début des années 2000, la recrudescence des maladies infectieuses d'origine animale initie le projet *One Health*, « une seule santé », supporté par l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et l'organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO). L'enjeu de l'approche *One Health* est de penser la santé comme une interconnexion entre santé des humains, des animaux et de leur environnement et de favoriser l'interdisciplinarité des travaux scientifiques et opérationnels sur les problématiques sanitaires.

Ce concept vise notamment à étudier l'effet des perturbations de l'environnement générées par les activités humaines sur la santé humaine et animale. Dans ce contexte, il émerge qu'en très peu de temps nos modes de vie modernes ont considérablement remodelé l'environnement lumineux, thermique et chimique auquel les humains, les animaux et les végétaux sont exposés. C'est pourquoi, il est urgent et essentiel de connaître les effets de ces changements environnementaux sur la santé des organismes et notamment leur impact sur les rythmes biologiques. En effet, la pollution lumineuse (telle que l'exposition lumineuse induite par le travail en horaire décalé, la lumière artificielle nocturne et l'exposition aux écrans), le réchauffement climatique et la pollution chimique aux perturbateurs endocriniens pourraient avoir des impacts préoccupants sur les mécanismes photoneuroendocriniens régulant les rythmes biologiques circadiens et saisonniers (Bedrosian *et al.*, 2016 ; Moralia *et al.*, 2022).

La lumière artificielle nocturne interfère notamment avec l'interprétation des indicateurs photopériodiques naturels et son impact est de plus en plus étudié chez les espèces saisonnières pour lesquelles le signal photopériodique est critique pour synchroniser les fonctions biologiques aux saisons (Liu *et al.*, 2022). Le réchauffement climatique altère considérablement la disponibilité des ressources alimentaires et désynchronise la planification photopériodique des naissances avec les ressources alimentaires saisonnières (Post et Forchhammer, 2008). L'impact modulateur de la température sur l'intégration photopériodique est aussi un facteur à prendre en compte dans le contexte de la perturbation des rythmes saisonniers par le réchauffement climatique (Van Rosmalen *et al.*, 2022). Enfin, un nombre croissant d'études signale que des produits chimiques continuellement répandus dans les milieux terrestres, aquatiques et atmosphériques ont des activités de perturbation endocrinienne impactant notamment l'activité des hormones thyroïdiennes (Gutleb *et al.*, 2016 pour revue) et des stéroïdes sexuels (Amir *et al.*, 2021 pour revue) qui jouent un rôle essentiel dans les rythmes saisonniers. Pourtant, l'effet de ces perturbateurs endocriniens sur la régulation saisonnière des fonctions reproductrices et métaboliques n'a encore jamais été étudié.

Le chapitre suivant traitera spécifiquement des perturbateurs endocriniens : leur définition, leurs caractéristiques et leurs effets avérés et suspectés sur la santé humaine et animale. L'objectif sera d'évaluer en quoi leurs mécanismes d'action pourraient potentiellement altérer la régulation saisonnière de la reproduction et du métabolisme énergétique.

Chapitre 2 : Les perturbateurs endocriniens
I. <u>Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?</u>

Dans nos sociétés modernes, 95% des produits et articles manufacturés reposent sur l'industrie chimique. Au cours des dernières décennies, le marché mondial a produit et enregistré au moins 350 000 substances chimiques (Wang *et al.*, 2020), dont seule une petite fraction a fait l'objet d'évaluation de sécurité par des toxicologues (McPartland *et al.*, 2015). Récemment, un millier de ces substances ont été identifiées comme des composés potentiellement actifs sur le système endocrinien, appelés perturbateurs endocriniens (PE) (Flaws *et al.*, 2020 ; rapport OMS-PNUE, 2012).

1. Définition

En 1991, Théodora Colborn, une zoologiste américaine qui étudie les effets des contaminants chimiques des Grands Lacs américains sur la faune, réunit une vingtaine de scientifiques lors de la conférence de Wingspread afin de faire le point sur les connaissances à ce sujet. À l'issue de ce colloque, les scientifiques, issus de diverses spécialités, publient un consensus selon lequel « *Many compounds introduced into the environment by human activity are capable of disrupting the endocrine system of animals, including fish, wildlife, and humans* ». Le terme « perturbateur endocrinien » est né. Cinq ans plus tard, le consensus est validé par la Commission Européenne et des programmes de recherche sont massivement lancés. En 2002, l'OMS propose de définir les PE comme « substances exogènes ou mélanges de substances qui altèrent le(s) fonction(s) du système endocrinien et, par conséquent, cause des effets délétères sur la santé d'un organisme intact, de ses progénitures ou de (sous-)populations ». Cette définition prévaut actuellement au sein de la communauté scientifique et des entités réglementaires.

2. Sources d'exposition

Les PE sont présents dans les produits émis par les combustions industrielles (dioxines, furanes, polychlorobiphényles : PCB) ; les plastifiants (bisphénol A : BPA, phtalates) ; les retardateurs de flamme (polybromodiphényléthers) ; les pesticides (composés organochlorés, fongicides, herbicides) ; les cosmétiques (parabènes) ; et certains médicaments (distilbène, anti-douleurs). Ils sont aussi trouvés à l'état naturel, sous forme de phyto-estrogènes (isoflavones, coumestans, lignanes). De ce fait, une multitude de produits de la vie courante contiennent des PE, incluant des produits alimentaires, des produits d'hygiène et ménagers, des produits de traitement (agricultures, matériaux), des jouets et certains traitements médicaux (figure 25).



Figure 26 : Les sources de PE.

De nombreuses familles de PE sont retrouvées dans les produits chimiques issus de la production alimentaire, de l'activité industrielle, des produits domestiques et médicaux. Modifié de Sargis et Simmons, 2019.

Les PE contaminent tous les compartiments da la biosphère : l'air, les sols, les sédiments et les milieux aquatiques (Crain *et al.*, 2007). De plus, pour répondre à des usages industriels, certains PE, tels que les PCB et les composés organochlorés, ont été synthétisés avec des propriétés de résistance aux dégradations biologiques. De ce fait, ces types de PE, appelés polluants organiques persistants (POP), s'accumulent dans l'environnement et, de par leur nature lipophile, s'accumulent aussi dans les tissus vivants et dans la chaîne alimentaire. Des substances bannies par les réglementations depuis des décennies sont encore détectées à des niveaux élevés dans l'environnement et subsistent dans les tissus de pratiquement tous les animaux ou humains testés (Calafat et Needham, 2007). D'autres types de PE, comme le BPA et les phtalates, n'ont pas de propriétés intrinsèques de persistance et de bioaccumulation. Ils sont rapidement dégradés par biodégradation, irradiation solaire ou volatilisation dans l'environnement et les organismes en permanence du fait de leur production et de leur utilisation continues (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009 pour revue).

Ainsi, les organismes sont constamment exposés aux PE du fait de la diversité des sources d'exposition, leur bioaccumulation et leur utilisation massive continue. L'exposition aux PE est néanmoins variable en fonction des régions du globe, du fait des différences réglementaires entre pays, des déversements toxiques accidentels locaux et de la disparité de l'industrialisation des régions. Toutefois, certains PE (notamment les POP) sont détectables dans des environnements dits « vierges », à des distances éloignées du site où ils ont été produits, utilisés ou rejetés (Bhardwaj *et al.*, 2018). Cela peut être dû à des courants d'eau et d'air et à des migrations d'animaux contaminés qui s'intègrent à la chaîne alimentaire des régions vierges.

Les PE entrent dans l'organisme par plusieurs voies incluant l'ingestion d'aliments et d'eaux contaminés, l'inhalation des fumées, vapeurs et plus généralement de l'air contaminé et le contact transcutané. Dans l'organisme, les PE sont capables de traverser les barrières placentaire et hématoencéphalique pour exercer leurs effets endocriniens (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2020 pour revues).

Aussi, chez les humains, certaines catégories professionnelles travaillant avec des pesticides, fongicides et des produits chimiques industriels sont plus à risque d'être exposées aux PE (Phillips *et al.*, 1989 ; Abell *et al.*, 2000, Padungtod *et al.*, 2000).

3. Mécanismes d'action

En 2020, une déclaration de consensus d'experts sur les PE a publié les principaux mécanismes d'action des PE (La Merrill *et al.*, 2020 ; voir aussi Combarnous et Nguyen, 2019 pour revue, figure 26) qui sont énoncés d'une façon non exhaustive ci-dessous.

Dans l'organisme, les hormones sont capables de se lier à des récepteurs membranaires ou d'être transportées, passivement ou sélectivement, dans le compartiment intracellulaire où elles se lient à des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription à activité liganddépendante régulant l'expression de centaines de gènes impliqués dans diverses fonctions. Les PE qui présentent des similitudes structurelles avec les hormones peuvent être des agonistes ou des antagonistes des récepteurs hormonaux nucléaires et membranaires. De ce fait, ils peuvent altérer les régulations géniques médiées par les hormones, incluant par exemple l'expression des récepteurs hormonaux.

Les hormones modulent également des processus épigénétiques tels que la méthylation et l'acétylation de l'ADN et des histones ainsi que l'expression d'ARN non codants. En mimant ou en bloquant l'action des hormones, les PE peuvent altérer les processus épigénétiques que les hormones régissent, ou induire des changements épigénétiques interférant avec leurs actions, telles que l'expression des récepteurs hormonaux ou des éléments de réponse aux hormones. En plus de leurrer les récepteurs hormonaux et de perturber d'importantes régulations géniques et épigénétiques hormono-dépendantes, les PE peuvent directement perturber des mécanismes régulateurs du système endocrinien. Dans ce cas, les PE peuvent présenter des structures bien différentes des hormones endogènes car ils n'interagissent non pas avec les récepteurs hormonaux mais directement sur des composants des voies de signalisation, en aval de l'activation des récepteurs. Ils peuvent alors atténuer ou potentialiser la signalisation intracellulaire, mais aussi perturber l'internalisation et la dégradation des récepteurs hormonaux. Les PE peuvent aussi perturber la biosynthèse et la dégradation des hormones. Grâce à leur nature hydrophobique, ils peuvent entrer en compétition avec les protéines hydrophobiques de transport des hormones. Ces processus conduisent à une modification de la concentration des hormones actives sous leurs formes libres.



Figure 27 : Schéma des principaux mécanismes d'action des PE sur le système endocrinien. Les changements épigénétiques ne sont pas représentés. Modifié de Cambarnous et Nguyen, 2019.

4. Les caractéristiques des PE

Les PE regroupent un panel de molécules hétérogènes, qui ne partagent pas des structures chimiques particulièrement similaires entre elles, ce qui constitue un challenge considérable pour prédire les potentiels effets de perturbation endocrinienne de ces composés chimiques. Néanmoins, les PE possèdent souvent une fraction phénolique imitant partiellement la structure des hormones stéroïdiennes naturelles, et certains, comme les dioxines, les PCB et les pesticides, partagent des groupements halogènes tels que le chlore et le brome. En outre, les PE présentent des caractéristiques pharmacologiques particulières en raison de leur profil dose-réponse parfois atypique et leur capacité à

induire des effets cumulatifs et synergiques potentialisateurs lorsqu'ils sont sous forme de mélange. Finalement, les PE exercent des effets variables en fonction de la période de la vie où les organismes sont exposés.

a. Effets à faibles doses et non-monotones

La maxime bien connue de Paracelse « *Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison* » a fondé les principes de la toxicologie il y a environ 400 ans. La toxicologie moderne repose toujours sur le principe fondamental que la relation entre l'effet et la dose est linéaire et l'utilise pour définir les limites d'exposition à des produits chimiques susceptibles d'avoir des effets nocifs. Pourtant, les propriétés des PE controversent ce dogme.

Les effets à faible dose se définissent par des changements biologiques se produisant à des doses inférieures à celles utilisées dans les études toxicologiques classiques (Melnick *et al.*, 2002). En effet, des doses extrêmement faibles de PE sont capables d'altérer les systèmes endocriniens et les fonctions biologiques. Par exemple, des molécules exogènes oestrogéniques peuvent induire des altérations du système reproducteur à des concentrations à peine plus élevées que celles de l'œstradiol naturellement présent dans l'organisme (Sheehan *et al.*, 1999). Dans ces cas de figure, la dose à l'origine d'un effet est si faible (pouvant aller jusqu'à la gamme du picomolaire : Vandenberg *et al.*, 2012) qu'elle ne permet pas de déterminer un seuil d'exposition de sécurité.

De plus, ces faibles doses ont parfois des effets encore plus puissants que les fortes doses. Certains PE présentent des courbes dose-réponse en U ou U inversé, définies mathématiquement par un changement de signe de leur pente, les qualifiant de non-monotones (Kohn et Melnick, 2002; Conolly et Lutz, 2004, figure 27). Cet effet dose-réponse non-monotone a été rapporté pour plusieurs PE et plusieurs hormones endogènes dans des expériences de culture cellulaire *in vitro*, d'expérimentations animales *in vivo* et même dans des études épidémiologiques chez l'humain (Vandenberg *et al.*, 2012). Par exemple, une méta-analyse recense que 12 à 24% des expériences *in vitro* étudiant les effets dose-réponse du BPA rapportent des effets non-monotones, notamment sur l'expression de certains gènes et protéines, la sécrétion hormonale, la prolifération cellulaire et les anomalies chromosomiques (Vandenberg, 2014). *In vivo*, chez la souris, l'exposition fœtale au BPA perturbe des paramètres métaboliques (poids corporel, prise alimentaire, nombre et volume des adipocytes, hormones métaboliques) à des faibles doses mais pas à de fortes doses (Angle *et al.*, 2013). Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour expliquer les effets dose-réponse non monotones des hormones et des PE (Vandenberg *et al.*, 2012), incluant :

- La cytotoxicité : les fortes doses d'hormone et de PE peuvent être cytotoxiques ;

- La spécificité cellulaire et tissulaire des récepteurs : les cellules répondent différentiellement à une hormone ou un PE en fonction des récepteurs qu'elles expriment. L'effet final peut être la somme de deux effets induits par l'activation de mécanismes cellulaires opposés (par exemple, prolifération cellulaire *vs* apoptose);
- La sélectivité des récepteurs : une hormone ou un PE peut se lier sélectivement à un type de récepteur à faible dose et se lier à plusieurs types de récepteur à forte dose ;
- Le nombre de récepteurs : l'activation d'un récepteur hormonal nucléaire induit la transcription de gènes cibles puis l'inactivation et la dégradation du récepteur par le protéasome. Quand le nombre de récepteurs produits n'est pas égal au nombre de récepteurs dégradés, l'effet peut diminuer à mesure que la concentration d'hormone ou de PE augmente ;
- La désensibilisation des récepteurs : l'exposition continue ou répétée de l'hormone ou du PE induit une inactivation du récepteur différente selon la dose.

En 2012, on recensait déjà 70 PE à effets dose-réponse non-monotones. Pourtant, la réglementation actuelle des produits chimiques se base encore sur les effets des substances à fortes doses pour définir les doses de référence, telles que la dose tolérable maximale, la dose la plus faible avec effet nocif observé (LOAEL) et la dose sans effet toxique observable (NOAEL). Le seuil de sécurité, dose pour laquelle aucun effet délétère n'est observable en-dessous de cette dose, est obtenu en divisant la NOAEL par un facteur de correction pour tenir compte des variabilités individuelles et inter-espèces. Ce seuil de sécurité est rarement testé et est uniquement basé sur la relation linéaire entre la dose et l'effet, donc ne prend pas en compte le caractère non-monotone de l'effet de nombreux PE (Vandenberg *et al.*, 2012).



Figure 28 : Exemples de courbes dose-réponse (A) linéaires, (B) non-linéaires monotones et (C) non-monotones.

Lors des réponses non-monotones, le signe de la pente change une fois ou plus. Dans ce cas de figure, l'effet à une ou plusieurs doses ne permet pas de prédire les effets à d'autres doses. Modifié de Vandenberg, 2012.

b. Effets des mélanges de PE

Jusqu'à présent, la majorité des études ont investigué les effets et les mécanismes d'action de PE pris individuellement. Pourtant, des mélanges de centaines de PE sont présents en permanence dans l'environnement et ils agissent donc rarement isolément. Il est donc indispensable d'évaluer les effets des mélanges de PE. Ces dix dernières années de recherche ont mis en évidence que les mélanges de PE peuvent induire des effets additifs, synergiques et antagonistes (Martin et al., 2021, figure 28). Par exemple, une étude a montré sur des explants de testicules fœtaux humains que la dose de BPA nécessaire pour diminuer de 50% la production de testostérone était divisée par 10 lorsque le BPA est combiné à 7 autres PE (Gaudriault et al., 2017 ; figure 28). Aussi, des PE qui, testés individuellement, n'ont pas d'effets nocifs peuvent produire des effets significatifs lorsqu'ils sont testés au sein d'un mélange (Axelstad et al., 2014). Les stratégies principales d'étude reposent sur la comparaison des effets de PE seuls et de leurs effets potentiels lorsqu'ils agissent de concert. Une autre méthode est de reconstituer un mélange de PE environnemental (détecté dans des tissus humains/animaux ou échantillonné dans l'environnement) et de le tester in vitro et/ou in vivo en comparaison à une condition contrôle. Par exemple, une étude épidémiologique suédoise a corrélé la présence de plusieurs PE dans le sang et les urines de femmes enceintes à un retard de langage chez leurs enfants. Ce mélange a été reconstitué en laboratoire et testé sur des modèles cellulaires et in vivo démontrant les mécanismes d'une perturbation du système thyroïdien et des troubles neuro-développementaux (Caporale et al., 2022). Des modèles mathématiques prédictifs se développent de plus en plus pour palier à la multitude de combinaisons possibles des PE à tester en laboratoire (Hamid et al., 2021).





(A) schéma conceptuel des effets de mélanges de substances et (B) exemple de l'effet synergique d'un cocktail de 8 PE sur l'inhibition de testostérone *in vitro* : lorsque le BPA est présent dans un mélange avec 7 autres PE il réduit la concentration de testostérone (IC 50) à une dose 10 fois plus faible que lorsqu'il agit seul (Gaudriault *et al.*, 2017).

c. Fenêtres critiques de sensibilité et effets à long-terme

Les PE peuvent avoir des conséquences différentes selon la période de vie à laquelle les individus sont exposés, notamment s'il s'agit de la période fœtale, pendant l'enfance ou à l'âge adulte.

La transmission des PE par la mère est probable puisque les PE traversent la barrière placentaire et se retrouvent dans le liquide amniotique, le sang du cordon ombilical et le méconium (Barr *et al.*, 2007). De plus, des concentrations notables de PE lipophiles persistent dans le lait maternel et exposent les petits durant la lactation (Grandjean et Jensen, 2004).

Par ailleurs, les nourrissons et les enfants peuvent être davantage exposés aux PE que les adultes car ils consomment deux fois plus d'eau (ramené au poids corporel), ont une absorption intestinale, une ventilation pulmonaire et un rapport surface/volume plus importants que les adultes et ils présentent aussi des comportements mains-bouche. Ces caractéristiques physiologiques et comportementales favorisent l'ingestion, l'inhalation et le contact cutané de PE (Selevan et al., 2000 ; Braun, 2017). Aussi, la plus faible capacité des fœtus à métaboliser les xénobiotiques peut induire une accumulation de PE dans leurs tissus. C'est notamment le cas de plusieurs cytochromes P450, responsables du métabolisme de nombreux produits chimiques, qui sont plus faiblement exprimés chez le fœtus (Cresteil, 1998). Enfin, la période développementale est finement orchestrée par l'action des hormones. Par exemple, les hormones thyroïdiennes régulent le neurodéveloppement, en particulier les étapes de migration neuronale, synaptogénèse et myélinisation (Zoeller et Rovet, 2004). La testostérone et l'hormone antimüllerienne fœtale conditionnent la différentiation sexuelle (Rey et al., 2000). Les gonadotrophines et les stéroïdes sexuels augmentent temporairement pendant la période post-natale de « mini-puberté » qui active momentanément l'axe gonadotrope et détermine le développement et la maturation du système reproducteur (Lucacioni et al., 2020). Ainsi, ces étapes développementales hormono-dépendantes peuvent être la cible des PE et leurs perturbations peuvent avoir des conséquences physiologiques à long-terme. De ce fait, les PE sont considérés comme des facteurs potentiels des « origines développementales de la santé et de la maladie » (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD). Cette approche propose que les 1000 premiers jours de la vie constituent une période particulièrement sensible aux influences environnementales. D'après ce concept, l'environnement maternel (ou l'environnement d'incubation de l'œuf) et l'environnement externe interagissent avec les gènes d'un individu et déterminent sa propension à développer une maladie ou un dysfonctionnement plus tard dans la vie (Barker, 2003 ; Storme et al., 2018). Par exemple, l'exposition du fœtus au BPA augmente le risque d'obésité et de diabète de type 2 à l'adolescence et à l'âge adulte chez l'humain (Wang et al., 2012).

En plus d'affecter le système endocrinien et d'induire des effets néfastes chez les individus exposés et leur descendance directe, les effets des PE peuvent également être transmis sur plusieurs générations. Les mécanismes de transmission épigénétique dans les cellules germinales sont de plus en plus analysés pour comprendre ces effets transgénérationnels (Anway et Skinner, 2006, Skinner *et al.*, 2011).

5. Les conséquences sur la santé

Bien avant la conférence de Wingspread de 1991, les biologistes ont été préoccupés par les effets des produits chimiques sur la santé des organismes, notamment sur les animaux d'élevage et sauvages. Entre les années 20 et 40, des rapports indiquent que des animaux d'élevage présentaient des fertilités anormales après avoir consommé des plantes et des céréales enrichies en PE naturels tels que les mycoestrogènes et les phytoestrogènes (Darbre, 2019). En 1962, dans son livre « *Silent spring* » la biologiste Rachel Carson accuse l'utilisation massive du pesticide dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) de provoquer une diminution de l'épaisseur des coquilles d'œuf et un déclin de la reproduction de certains oiseaux de proie en Amérique du Nord (Carson, 1962). Les effets délétères du DDT ont été confirmés quand, en 1980, son déversement accidentel dans le lac Apopka a provoqué une diminution de la viabilité d'œufs d'alligators et une augmentation de leur mortalité juvénile (Woodward *et al.*, 1993).

En raison de l'omniprésence des PE dans l'environnement, il est difficile d'établir des preuves solides de causalité entre leur exposition et la survenue de troubles biologiques. Néanmoins, les évidences sur les animaux d'élevage et sauvage, sentinelles de la pollution chimique, ont été déterminantes pour informer des effets de la pollution environnementale sur la santé animale et humaine. Des études épidémiologiques ont rapporté que l'exposition aux PE augmentait considérablement les risques de développer des troubles de la reproduction (Laws *et al.*, 2021), des cancers des organes du système reproducteur (Kahn *et al.*, 2020), des pathologies métaboliques (Heindel *et al.*, 2017) et des troubles cognitifs (Pinson *et al.*, 2016) chez l'humain. Des chercheurs ont estimé le coût économique de la prise en charge des pathologies liées à l'exposition d'une dizaine de PE à haute probabilité de causalité, qui s'élèverait à environ 163 milliards d'euros annuels en Europe (Trasande *et al.*, 2016) et à 340 milliards de dollars annuels aux Etats-Unis (Attina *et al.*, 2016).

Les effets et mécanismes d'action des PE peuvent être variables, aussi ils seront plus spécifiquement explicités avec l'exemple du BPA qui a fait l'objet des travaux de cette thèse.

II. Zoom sur le bisphénol A

1. Origine et usage

Le BPA est un composé synthétique de la famille des composés aromatiques. Il est constitué de deux noyaux phénoliques liés par un pont méthyl sur lequel deux groupements méthyl sont attachés (figure 29).



Figure 30 : Structure du BPA.

Il a été synthétisé par le chimiste Aleksandr Dianin en 1891 et fut étudié dans les années 1930 dans l'objectif de trouver des estrogènes de synthèse pour prévenir les fausses couches. Il sera mis de côté au profit de la découverte du diéthylsilbestrol (DES) qui sera alors prescrit pendant 40 ans malgré de forts effets de perturbation endocrinienne favorisant l'apparition de cancers du sein chez les femmes traitées et induisant des effets transgénérationnels notables sur 3 générations. À partir des années 1960, l'industrie du plastique met sur le marché le polycarbonate à base de monomères de BPA, sans se préoccuper des effets estrogéniques du composé (Vogel, 2012). En 1963, la *Food and Drug Administration* (FDA) autorise l'utilisation du BPA dans les matériaux en contact avec les aliments en l'absence de données publiées sur ses effets sur la santé (https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application). Depuis, le BPA est massivement utilisé dans la production de plastiques polycarbonylés et de résines époxy. En 2020, la capacité du marché mondial du BPA était de 7,72 millions de tonnes par an et devrait augmenter à un taux de croissance annuel moyen de 5,3% pour la période de 2021-2028 (https://www.emergenresearch.com/industry-report/bisphenol-a-market).

Environ 64% du BPA produit se trouve dans les plastiques polycarbonylés et 34% dans les résines époxy. Sa polymérisation en polycarbonate permet de fabriquer des produits en matière plastique rigide tels que certains équipements médicaux et électriques, CD, DVD, boîtiers électroniques, verres de lunette, bonbonnes d'eau, bouteilles, biberons, récipients et ustensiles alimentaires. Les résines époxy recouvrent des objets et des équipements pour les protéger de l'oxydation. Elles se trouvent sur les coques de bateau, certains meubles, sols, tuyauteries (notamment d'eau potable), fûts et dans la pellicule interne des boîtes de conserve et des canettes. Le BPA sous forme libre recouvre aussi certains papiers thermiques. Finalement, une petite fraction de sa production est utilisée dans la synthèse de résines polyester, polysulfone, polyétherimide et polyacrylate (Manzoor *et al.*, 2022 ; Hahladakis et al., 2023 pour revues).

À la fin des années 90, les premières études académiques sur le BPA démontrent que l'exposition de souris gestantes à 2 µg de BPA/kg/jour, soit à une dose 25 000 fois plus faible que la LOAEL, induit une hypertrophie de la prostate des petits mâles (vom Saal *et al.*, 1998 ; Nagel *et al.*, 1999). Depuis ces études pionnières, de nombreuses recherches ont été publiées pour rapporter que l'exposition au BPA induit de nombreux risques pour la santé.

2. Exposition au BPA

a. Exposition environmementale

En raison de sa production et de son utilisation massive, le BPA est omniprésent dans l'environnement. Les rejets d'effluents des usines de fabrication et des stations d'épurations municipales, les lixiviats de décharge (substances produites sous l'action de l'eau de la pluie et de la fermentation des déchets enfouis), la combustion des déchets domestiques et la dégradation des matières plastiques représentent les sources principales de BPA dans l'environnement (Teuten *et al.*, 2009 ; Fu et Kawamura, 2010). Ces sources contaminent les eaux de surface (rivières, mers), l'eau potable, les boues d'épuration, les sols, les sédiments et l'air extérieur, en dépit du fait que 90% du BPA soit éliminé par le traitement des eaux usées (Fürhacker *et al.*, 2000 ; Dorn *et al.*, 1987, figure 30).

Le BPA est dégradé dans l'environnement, avec des demi-vies d'environ 4,5 jours dans l'eau et le sol et de moins d'un jour dans l'air. Du fait de ces différentes vitesses de dégradation, le BPA peut être transporté sur des centaines de kilomètres dans les rivières, mais son potentiel de transport dans l'air est négligeable (Cousins *et al.*, 2002). La concentration environnementale de cette substance dépend clairement du degré d'urbanisation et d'industrialisation des zones où les mesures sont faites (Michalowicz *et al.*, 2014).

Le BPA est assez peu soluble dans l'eau et modérément lipophile, sa capacité de bioaccumulation est donc considérée comme modérée (Corales *et al.*, 2015). Cependant, malgré sa faible demi-vie et son potentiel modéré de bioaccumulation, le BPA est détecté dans de nombreuses matrices environnementales, incluant les tissus d'animaux sauvages, d'animaux d'élevage et de compagnie, et d'humains.

Un nombre relativement faible d'études a mesuré la contamination au BPA des espèces sauvages et ont majoritairement analysé des tissus d'espèces aquatiques pour lesquelles des concentrations variables de BPA ont été retrouvées, notamment chez les phoques (Nehring *et al.*, 2017), poissons, amphibiens, mollusques, gastropodes, crustacés, insectes aquatiques et polychètes. Par exemple, chez les poissons des concentrations de 0,2 à 13 000 ng/g de BPA ont été détectées (Corales *et al.*, 2015). À notre connaissance, la contamination au BPA des espèces terrestres sauvages a été uniquement documentée chez les vers de terre (Markman *et al.*, 2007), les goélands (Nehring *et al.*,

2017) et les chauves-souris (Gonkowski *et al.*, 2023) pour lesquels des concentrations de BPA ont été retrouvées soit dans des échantillons de l'ensemble de l'organisme, les plumes ou les fèces. Chez les animaux d'élevage, des concentrations de BPA, de l'ordre du ng/g, ont été reportées dans le lait de vache (Frankowski *et al.*, 2022) et les muscles de cochon (Makowska *et al.*, 2022).

b. Exposition humaine

Les humains et les animaux domestiques peuvent être exposés au BPA par la contamination environnementale, mais aussi par les cycles répétés de chauffage et de lavage des contenants alimentaires en plastiques polycarbonylés, la présence d'aliments/boissons acides ou basiques dans ces contenants et la stérilisation des boîtes de conserve. En effet, la chaleur ainsi que les conditions acidobasiques hydrolysent les ponts ester qui lient les molécules de BPA, ce qui favorise leur libération et leur migration dans la nourriture et les boissons (Howdeshell *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Vanderberg *et al.*, 2007; von Goetz *et al.*, 2010, figure 30). L'inhalation de poussières d'intérieur et de ciment dentaire contribue aussi à l'exposition humaine (Olea *et al.*, 1996; Calafat *et al.*, 2008; Geens *et al.*, 2009). Le BPA entre ainsi dans l'organisme des humains par l'ingestion de nourriture et de boissons contaminées et l'inhalation de poussières. Chez certaines populations professionnelles, l'exposition au BPA peut aussi se faire par contact cutané direct (Corales *et al.*, 2015).



Figure 31 : Illustration des sources d'exposition au BPA pour les humains, les animaux d'élevage et les animaux sauvages.

Des études rapportent des taux sériques de BPA libre dans la population humaine de l'ordre du pg/mL au ng/mL (Vandenberg *et al.*, 2010, Teeguarden *et al.*, 2013, 2015). Toutefois, la détection du BPA dans la circulation sanguine humaine divise les scientifiques académiques de ceux de la FDA et de l'industrie. D'après ces derniers, des mesures de BPA libre dans le sérum sont forcément causées par des contaminations lors de la collecte et du traitement du sang, car la courte demi-vie (également débattue) du BPA libre dans l'organisme, couplée à sa relative faible teneur dans l'environnement ne devraient pas permettre sa détection sérique (Churchwell *et al.*, 2014 ; Corrales *et al.*, 2015, vom Saal et Vandenberg, 2021). Néanmoins, le BPA (sous forme totale) est retrouvé dans les urines de 90% de la population américaine (Calafat *et al.*, 2008). Le BPA a aussi été détecté dans le cerveau, le foie et le tissu adipeux à des concentrations <10 ng/g. Il a été mesuré à des taux variant entre 0,1 et 50 ng/g dans le sang du cordon ombilical du fœtus, le foie fœtal et les fluides amniotiques (Corales *et al.*, 2015). Une étude le détecte à une concentration notable de 274 ng/g dans le placenta (Troisi *et al.*, 2014). En 2015, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) estime que la dose moyenne de BPA ingérée quotidiennement est de 0,37 µg/kg/jour pour les jeunes enfants (6-36 mois) ; 0,15 µg/kg/jour pour les adolescents ; et 0,13 µg/kg/jour pour les adultes (EFSA CEF Panel, 2015, 2023).

Sur la base d'études toxicologiques, la dose journalière tolérable (DJT) présumée sans risque pour la santé humaine par les autorités était de 50 μ g/kg/jour. En 2015, l'EFSA propose de diminuer la DJT à 4 μ g/kg/jour du fait d'incertitudes dans les données. Très récemment, en avril 2023, à la lumière de nouvelles études, les experts de l'EFSA ont établi une nouvelle DJT à 0,2 ng/kg/jour, soit à une dose 20 000 fois plus faible que le précédent seuil et largement inférieure aux estimations d'exposition de la population générale au BPA (EFSA CEF Panel, 2023).

c. Biodisponibilité

Des études pharmacocinétiques suggèrent que le BPA ne s'accumule pas dans les tissus et que 90% est éliminé dans les urines en 6 h (Völkel *et al.*, 2002). Cependant, la durée de vie du BPA dans l'organisme varie en fonction de la voie d'exposition, l'âge et l'espèce. Le BPA ingéré est absorbé par le compartiment gastro-intestinal puis subit un métabolisme de premier passage hépatique où une majorité du BPA est conjuguée en BPA-glucuronide et en BPA-sulfate (Völkel *et al.*, 2002 ; Inoue *et al.*, 2003). Les formes conjuguées et la forme libre minoritaire rejoignent la circulation sanguine et sont distribuées dans les tissus puis excrétées dans les urines (Völkel *et al.*, 2002 ; Teeguarden *et al.*, 2011).

Cependant, le BPA peut aussi être absorbé par la muqueuse sublinguale et la peau, et dans ces cas il ne subit pas le premier passage hépatique et est biodisponible plus longuement (Stahlhut *et al.*, 2009, Gayrard *et al.*, 2013). De plus, le principal métabolite du BPA, le BPA-glucuronide, longtemps considéré comme inactif sur les récepteurs hormonaux (Matthews *et al.*, 2001), induit l'accumulation de lipides et augmente l'expression de marqueurs de l'adipogénèse *in vitro* (Boucher *et al.*, 2015).

Quelques organes comme les poumons, le petit intestin et le placenta expriment des β -glucuronidases, des enzymes à activité de déconjugaison, autrement dit, capables de réverser la glucuronidation. Des études démontrent que, chez le rat et la brebis, le BPA-glucuronide maternel est transporté vers le fœtus et y est détecté avec du BPA libre en raison d'une forte activité de déconjugaison et du faible métabolisme des xénobiotiques chez le fœtus (Gauderat *et al.*, 2016, 2017 ; Nishikawa *et al.*, 2010).

3. <u>Mécanismes d'action</u>

a. Action directe sur les récepteurs hormonaux

Le BPA a été intensivement étudié pour son mode d'action oestrogénique, car ses caractéristiques structurales lui confèrent la capacité de s'insérer dans les poches de liaison des récepteurs nucléaires aux œstrogènes ER α et ER β (Kuiper *et al.*, 1998 ; Kitamura *et al.*, 2005, Delfosse et al., 2012). Néanmoins, l'affinité du BPA pour ces récepteurs est relativement modeste, entre 100 à 10 000 fois plus faible que celle de l'œstradiol (Kuiper et al., 1998, Welshons et al., 2003). Il est bien établi que la fixation de l'œstradiol aux ER induit la translocation des récepteurs dans le noyau et, par conséquent, leur liaison aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) qui régulent la transcription des gènes. De plus, les ER α et ER β peuvent médier des effets rapides qui se produisent dans les secondes ou les minutes qui suivent la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs. Il est maintenant admis que ces effets extra-nucléaires dépendent des mêmes ER nucléaires qui peuvent se localiser à la membrane plasmique suite à des modifications post-traductionnelles. À la membrane plasmique, les ER activés interagissent avec d'autres protéines de signalisation (par exemple, le facteur de croissance) formant ainsi des complexes multimoléculaires médiateurs de la transduction rapide du signal. Plusieurs études in vitro démontrent que le BPA à fortes doses induit une activité transcriptionnelle médiée par les ER nucléaires (Vivacqua et al., 2003 ; Delfosse et al., 2012, Xu et al., 2017, Marino et al., 2012, Nadal et al., 2018), tandis qu'à faibles doses (nM), il peut aussi agir sur la voie non-génomique des ER extranucléaires. Le BPA induit notamment la prolifération de cellules cancéreuses via l'activation des ERa extra-nucléaires et la régulation des voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/AKT (Bolli et al., 2008). Par ailleurs, le BPA est un agoniste du récepteur membranaire aux œstrogènes G protein-coupled receptor 30 (GPR 30) pour lequel il présente une forte affinité (Thomas et Dong, 2006). De ce fait, en dépit de sa faible activité sur la voie nucléaire des ER, le BPA peut exercer des effets oestrogéniques via les récepteurs extra-nucléaires aux œstrogènes qu'il active à faibles doses (Nadal et al., 2018). Les effets oestrogéniques du BPA pourraient également être médiés par sa très forte affinité pour le récepteur nucléaire orphelin EERy qui interagit avec l'ERa pour réguler l'expression de gènes cibles communs (Takayanagi et al., 2006).

Le BPA peut également entrer en compétition avec les androgènes en se liant comme antagoniste au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Wang *et al.*, 2017). Peu d'études ont évalué les effets du BPA sur l'activité transcriptionnelle médiée par les AR. Une étude suggère qu'il empêcherait la formation du complexe ligand-récepteur capable d'aller activer les éléments de réponse aux androgènes (ARE) et la transcription de gènes cibles (Teng *et al.*, 2013).

Le BPA interagit aussi avec les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes sur lesquels il exerce un effet antagoniste. Il peut empêcher la liaison de la T3 sur ses récepteurs pour en moduler l'activité transcriptionnelle consécutive (Moriyama *et al.*, 2002). À des faibles doses (nM), Sheng et coll. suggèrent que le BPA n'entre pas en compétition avec la T3 mais induit le recrutement de co-répresseurs sur les récepteurs thyroïdiens, ce qui inhibe leur activité transcriptionnelle (Sheng *et al.*, 2012).

À des concentrations relativement fortes (μ M), le BPA interagit aussi avec le pregnane X receptor (PRX), un récepteur senseur des xénobiotiques dont l'activation régule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (Takeshita *et al.*, 2001 ; Sui *et al.*, 2012).

Finalement, en plus d'interagir avec une variété de récepteurs hormonaux, le BPA peut aussi moduler leur expression et par conséquent perturber la sensibilité des cellules et des tissus aux hormones. Par exemple, dans le système nerveux central de rongeurs, il altère l'expression des récepteurs nucléaires aux œstrogènes (Cao *et al.*, 2012), à l'oxytocine (Wolstenholme *et al.*, 2012) et à la vasopressine (Patisaul, 2017).

b. Modulation indirecte de l'activité hormonale

Le BPA n'altère pas seulement l'action des hormones en interagissant avec leurs récepteurs, mais il peut aussi moduler la disponibilité des hormones dans les tissus cibles en altérant leur synthèse. Par exemple, l'exposition au BPA (10 et $100 \mu g/ml$) de follicules ovariens murins en culture diminue l'expression de l'enzyme Cyp11a1 et de la protéine StAR impliquées dans la stéroïdogénèse et, en conséquence, réduit les niveaux d'androstènedione, de testostérone et d'œstradiol. Ces effets ont été complètement abolis lorsque l'exposition au BPA a été supprimée du milieu (Peretz et Flaws, 2013). Chez le rat, le BPA peut aussi inhiber l'expression des déiodinases de type 1 dans le foie *in vitro* et *in vivo* et celle des déiodinases de type 2 du tissu adipeux brun *in vitro*. Ceci est associé à de plus fortes concentrations de T4 dans le sérum (da Silva *et al.*, 2019).

Le BPA peut se lier aux protéines de transport sanguin des hormones sexuelles et thyroïdiennes mais avec une faible affinité suggérant une compétition insuffisante avec les hormones endogènes pour interférer sur le transport sanguin (Hodgert Jury *et al.*, 2000, Cao *et al.*, 2011, Sheikh *et al.*, 2017). Toutefois, chez l'homme, l'exposition au BPA est associée à une augmentation de l'expression des

protéines de transport des hormones sexuelles (SHBG) et à une diminution des concentrations circulantes des androgènes (Zhou *et al.*, 2013 ; Mendiola *et al.*, 2010).

Le BPA se lie aussi aux protéines de transport transmembranaire qui régulent l'entrée des hormones dans les cellules cibles. Par exemple, dans des cellules de rein en culture surexprimant le gène *MCT*8 humain codant pour la protéine de transport transmembranaire neuronale des hormones thyroïdiennes, la capacité de recapture de la T3 radiomarquée est réduite de 60% lorsque du BPA (μ M) est ajouté dans le milieu de culture (Dong et Wade, 2017).

Il existe très peu d'évidence d'un effet du BPA sur le métabolisme des hormones. Une étude *in vitro*, réalisée chez la truite de lac, a montré que 22,8 mg/l de BPA réduisaient le métabolisme hépatique de l'œstradiol de 24% et le métabolisme rénal de 52%. Néanmoins, dans cette étude l'exposition au BPA n'est pas représentative de la contamination réelle du BPA qui est plutôt de l'ordre du µg/l dans l'environnement aquatique (Crain *et al.*, 2007).

c. Régulation épigénétique

Le BPA a aussi la capacité d'exercer ses effets par des modifications épigénétiques. Ces modifications chimiques changent la conformation tridimensionnelle de la chromatine et, par conséquent, la disponibilité et l'expression des gènes, mais ne modifient pas la séquence de l'ADN. Les modifications épigénétiques comprennent des méthylations de l'ADN sur les dinucléotides CpG, des modifications chimiques post-translationnelles des queues d'histones (acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitinylation) et l'expression d'ARN non-codants capables d'interagir avec des ARNm cibles et d'inhiber leur traduction.

La première preuve que le BPA peut moduler la méthylation de l'ADN a été rapportée en 2006, lorsqu'il a été démontré que l'exposition néonatale à une faible dose de BPA rendait les rats plus susceptibles de développer des lésions néoplasiques de la prostate ; en induisant une hypométhylation précoce et prolongée du gène de la phosphodiestérase de type 4 (PDE4D4) conduisant à une expression génique plus élevée (Ho *et al.*, 2006). Une autre étude a constaté que l'exposition prénatale de souris Agouti au BPA entraîne une modification du phénotype de la couleur du pelage de la descendance, qui est due à une réduction de la méthylation du gène *agouti* dans les cellules germinales (Dolinoy *et al.*, 2007). D'autres études ont mis en évidence la vulnérabilité spécifique de la période prénatale aux changements épigénétiques induits par le BPA. Ainsi, chez les souris CD-1, l'injection *in utero* de BPA diminue la méthylation du gène *HOXA10* ce qui dérégule l'expression programmée de certains gènes et affecte la viabilité de l'embryon, alors que la même exposition de BPA chez des souris adultes n'a pas modifié le schéma de méthylation du gène *HOXA10* (Bromer *et al.*, 2010).

La méthylation n'est pas la seule modification épigénétique induite par le BPA. Plusieurs études ont rapporté la capacité du BPA à interférer spécifiquement avec l'expression de plusieurs microARN (miARN), des ARN non-codants de petites tailles (Avissar-Whiting *et al.*, 2010, Mao *et al.*, 2021, Lite *et al.*, 2019). L'exposition *in utero* au BPA augmente l'expression de l'histone méthyltransférase EZH2 dans la glande mammaire, ce qui augmente la triméthylation de l'histone 3 (H3) à la lysine 27 (H3K27me3), un évènement connu pour être un marqueur d'activation transcriptionnelle typique des cellules cancéreuses du sein (Doherty *et al.*, 2010).

Ainsi, le BPA possède la majorité des mécanismes d'action des PE. Il interagit avec les récepteurs hormonaux, induit des modifications épigénétiques dans des organes endocriniens ou des cellules germinales et altère plusieurs fonctions modulant la disponibilité des hormones à leurs récepteurs, telles que la synthèse des hormones et leurs transports dans les cellules. Toutefois, l'effet du BPA sur le transport des hormones dans le sang, leur métabolisme et leur clairance restent encore à démontrer ou confirmer (La Merrill *et al.*, 2020).

4. Effets sur la reproduction et le métabolisme énergétique

Les perturbations cellulaires, subcellulaires et génomiques induites par le BPA peuvent, à l'échelle des tissus et des systèmes neuroendocriniens intégrés, altérer les fonctions physiologiques telles que la reproduction et le métabolisme énergétique.

a. Effets sur la fonction de reproduction

L'exposition au BPA induit/est corrélée à de multiples effets délétères sur la fonction de reproduction de plusieurs espèces. Ces effets sont recensés d'une façon non exhaustive dans le tableau 1 et illustrés de quelques exemples référencés.

Chez l'humain, les études observationnelles corrèlent les concentrations urinaires ou sériques en BPA avec des modifications de paramètres reproducteurs (libido, qualité et intégrité génomique du sperme, fonctionnalité ovarienne, durée du cycle menstruel, tractus reproducteur masculin et féminin, survenue de la puberté) ; et ceci chez plusieurs types de populations, des travailleurs exposés à de fortes doses de BPA, des hommes et/ou des femmes présentant des troubles de la fertilité, mais aussi des hommes et/ou des femmes issus de la population générale. Chez les hommes, des études corrèlent notamment la baisse de désir sexuel, la dégradation de la qualité et de l'intégrité génomique du sperme et le retard pubertaire avec de fortes concentrations urinaires ou sériques en BPA. Chez les femmes, de fortes concentrations urinaires en BPA ont été associées à une réduction du nombre de follicules antraux dans le cas de prises en charge pour infertilité et à une prolongation de la phase lutéale du cycle menstruel dans la population générale. Par ailleurs, des concentrations urinaires élevées en BPA ont été trouvées chez des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (PCOS). Néanmoins, dans plusieurs études, l'exposition au BPA n'a pas été associée à une modification du temps nécessaire pour être enceinte. Ainsi, plusieurs études épidémiologiques indiquent des corrélations notables entre les concentrations de BPA dans l'organisme et l'occurrence de troubles de la fonction de reproduction chez l'humain mais ne permettent pas de conclure sur des liens de causalité.

La fonction de reproduction des animaux (principalement des rongeurs) a été investiguée à la suite de diverses expositions à des doses contrôlées de BPA. Même si les doses, les durées d'exposition et les moments d'exposition au cours du cycle biologique des individus varient en fonction des expériences, la majorité des études s'accordent à observer des altérations de nombreux paramètres reproducteurs lorsque les animaux sont exposés au BPA (tableau 1).

Les études réalisées sur les animaux sauvages permettent de mesurer la contamination au BPA des tissus échantillonnés mais peuvent difficilement évaluer les effets de l'exposition *in situ* sur les fonctions biologiques des animaux (Crain *et al.*, 2007 ; Oehlmann *et al.*, 2009). Pour prédire les effets sur les animaux sauvages, la stratégie principale utilisée en laboratoire est d'exposer des animaux ; majoritairement des poissons, amphibiens, crustacés, mollusques et quelques reptiles et oiseaux ; à des concentrations de BPA reflétant l'exposition en milieu naturel. Par exemple, les études présentées dans le tableau 1 pour les « animaux sauvages en conditions de laboratoire » ont utilisé des doses de BPA équivalentes à celles mesurées dans les eaux de surface (µg/l) (Crain *et al.*, 2007).

	Exemples chez l'humain	Exemples chez les animaux de	Exemples chez les animaux sauvages en
	(corrélation avec [BPA] urinaire ou sérique)	laboratoire	conditions de laboratoire
Libido/comportements sexuels	Réduction du désir sexuel hommes travailleurs exposés (<i>Li et al., 2010</i>)	Altération des comportements sexuels rats F1 mâles (↓) et femelles (↑), 40 µg/kg <i>(Farabollini et al., 2002)</i> ↓ rats F1 mâles, 25 µg/kg <i>(Reznikov et al., 2020)</i> ↓ souris F0 mâles, 50 µg/kg <i>(Picot et al., 2014)</i>	
Capacités de gestation	Temps nécessaire pour concevoir = couples adultes (<i>Jukic et al.</i> , 2016) = couples adultes (<i>Louis et al.</i> , 2014) = femmes enceintes (<i>Velez et al.</i> , 2015) = couples adultes (<i>Yeum et al.</i> , 2019)	Fertilité ↓ souris F3, 0,5 µg/kg (Ziv-Gal et al., 2015) ↓ souris F1, 25 ng – 25 µg/kg (Cabaton et al., 2011) = rats F1, F2, 0,2-200 µg/kg (Ema et al., 2001)	Fertilité ↑ mollusques, 5 µg/l (Jobling <i>et al.</i> , 2003), 0,19 µg/l (<i>Duft et al.</i> , 2003)
Dégradation de la qualité du sperme (densité, motilité, morphologie des spermatozoïdes)	travailleurs exposés (Xiao et al., 2009) infertiles (Meeker et al., 2010) ~19 ans (Lassen et al., 2014)	souris F0, 50 mg/kg (Park et al., 2020)	truites, 1,75 μg/l (<i>Lahnsteiner et al., 2005</i>) poissons rouge, 0,6-11 ng/μl (<i>Hatef et al., 2012</i>)
Réduction de l'intégrité de l'ADN spermatique	population générale adulte (Goldstone et al., 2015) infertiles (Meeker et al., 2010)	souris F0, 0,1-5 mg/kg (Pan et al., 2020) rats F0, 200 μg/kg (Liu et al., 2013)	

		Hyperplasie de la prostate	Changements structurels des testicules de
Anomalia du système		rats âgés F0, 10-90 μg/kg (Huang et al., 2018)	carpes, intersexualité , 1 μg/l (Mandich et al., 2007)
reproducteur mâle		chiens F0, 2-18 μg/kg (Wang et al., 2022)	Inversion sexuelle de xénopes, 22,8 µg/l (<i>Levy et al., 2004</i>)
		gerbilles F0, 40 μg/kg (Silva et al., 2019)	Anomalies des tubules séminifères de caïmans, inversion sexuelle, 90 μg/œuf (Stoker et al., 2003)
	\downarrow Nombre de follicules antraux	Atrésie des follicules ovariens	Atrésie des follicules ovariens de carpes,
Anomalie de la folliculogénèse	infertiles (Souter et al., 2013)	rats F0, 25 ng/kg-5 mg/kg (<i>Rodriguez-Lopez et al., 2019</i>) souris F1, 20-80 µg/kg (<i>Zhang et al., 2012</i>)	1 μg/l (<i>Mandich et al.</i> , 2007) mollusques, 50 μg/l (<i>Aarab et al.</i> , 2006)
		rats F1, 0,5-50 μ g/kg	
		(Santamarta et al., 2016)	
	↑ durée de la phase lutéale	↑ durée du cycle	Inhibition totale de l'ovulation de truites,
	population générale adulte	souris F1, 2-20 µg/kg (Honma et al., 2002)	5 µg/l (Lahnsteiner et al., 2005)
	(Jukic et al., 2016)	Cycles irréguliers	
Perturbation du cycle		rats F1, 1,2 mg/kg (Mendoza-Rodriguez et al.,	
menstruel/oestrien		2011)	
		Pas d'effet	
		rats F0, 0,25 ng/kg-5 mg/kg (Franssen et al.,	
		2016)	

	↑ patientes avec syndrome des ovaires	Kystes ovariens	Intersexualité des carpes, 1 µg/l (<i>Mandich et</i>
	polykystiques	souris F1, 1-1000 µg/kg (Newbold et al.,	al., 2007)
Anomalia du systàma	(Takeuchi et al., 2004)	2009)	Anomalies des oviductes de cailles,
nonnaduataun famalla		rats F0, 500 µg/kg (Fernandez et al., 2010)	formations ovotesticulaires, 200 μ g/g/œuf
reproducteur temene		Lésions prolifératives de l'oviducte	(Berg et al., 2001)
		souris âgées F0, 10-1000 µg/kg (Newbold et	
		al., 2007)	
	Testostérone	Testostérone	
	↑ hommes adultes	↓ rats mâles F0, 2 µg/kg	(Fotradia)
	= femmes adultes	(Jin et al., 2013)	
	(Galloway et al., 2010)	t rate formalize EQ. 6.2.2.5 modes	poissons-clowing males, $100 \mu g/kg$
		(Formandar at al. 2010)	(Gonzalez el al., 2021)
Altération des	* however, 10 over	(Fernandez et al., 2010)	
concentrations	$ $ nomines ~19 ans $(L_{\text{max}}, z_{\text{max}}, z_{\text{max}}) $	Œstradiol	11 katatastastarana
circulantes en	(Lassen et al., 2014)	↑ rats mâles F1, 2 μg/kg	poissons clowns mîles 100 µg/kg
hormones sexuelles		(Bai et al., 2011)	(Gonzalez et al., 2021)
	Œstradiol	↑ rats femelles F1, 3 μg/kg	
	= hommes/femmes adultes	(Gamez et al., 2015)	
	(Galloway et al., 2010)		

	Pas d'effet	Pas d'effet
	filles (Wolff et al., 2008; Watkins et al.,	rats F0, femelles, 50 mg/kg (Losa-Ward et al.,
	2014)	2012)
Altération de	Puberté tardive	Avance de la puberté
l'apparition de la	garçons	souris F1, femelles, 20 µg/kg
puberté	(Ferguson et al., 2014)	(Honma et al., 2002)
		Retard de la puberté rats F1, mâles, 0,5-5 mg/kg (<i>Oliveira et al.,</i> 2017)

Tableau 1 : Effets du BPA sur la reproduction.

Corrélation entre l'exposition au BPA et les troubles de la fonction de reproduction chez les humains, et effets délétères de l'exposition au BPA sur la fonction de reproduction d'animaux de laboratoire ou d'animaux sauvages exposés au BPA en condition de laboratoire. F0 = le paramètre a été évalué sur des animaux directement exposés au BPA en période post-natale ou à l'âge adulte. F1, F2, F3 = le paramètre a été évalué chez la descendance F1, F2 ou F3 suite à une exposition des individus F0.

b. Effets neuroendocriniens sur l'axe gonadotrope

Chez les mammifères, de nombreux travaux suggèrent que le BPA induit des effets délétères sur la fonction de reproduction en perturbant le centre de contrôle hypothalamique de la reproduction constitué des neurones à GnRH et de ses afférences régulatrices, les cellules hypophysaires gonadotropes et le rétrocontrôle des hormones sexuelles.

Les afférences de GABA, de glutamate, de kisspeptine et de RFRP-3 sur les neurones à GnRH peuvent être modifiées par l'exposition au BPA, en particulier en début de vie, chez diverses espèces animales (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021 pour revue).

Des études expérimentales étudiant la sensibilité des neurones à kisspeptine au BPA ont montré que la perfusion de BPA (10 nM) dans l'éminence médiane de singes rhésus femelles supprime la libération de kisspeptine (Kurian *et al.*, 2015) et que l'administration gestationnelle de BPA diminue l'expression de la kisspeptine dans l'ARC de rats femelles mais pas chez les mâles (Patisaul *et al.*, 2009). De la même façon, l'administration gestationnelle de BPA induit une réduction de l'expression de *Kiss1* dans l'ARC pendant la maturation du système reproducteur en période pubertaire chez des souriceaux et ceci est associé à une avance de l'apparition de la puberté (Ruiz-Pino *et al.*, 2019).

À l'inverse, d'autres études rapportent que l'administration néonatale et périnatale de BPA entraîne une augmentation de l'expression de Kiss1 dans l'hypothalamus des souriceaux mâles et femelles (Xi et al., 2011) et des rats femelles (Qiu et al., 2020). Chez des souris femelles en proestrus, l'exposition aigüe à 20 µg/kg de BPA induit une augmentation de l'expression de Kiss1 dans l'AVPV qui est dépendante des ERα et est associée à une élévation des concentrations circulantes d'œstrogènes et des gonadotrophines (Wang et al., 2014). À l'inverse, l'exposition chronique à 50 µg/kg/jour de BPA inhibe l'expression de kisspeptine dans l'AVPV via les ERa chez les souris femelles (Tang et al., 2014). Ces études suggèrent que l'expression de la kisspeptine peut être perturbée par le BPA, mais de façon différentielle en fonction du sexe, du stade de l'œstrus chez les femelles (Wang et al., 2014), de l'âge, de l'espèce, de la localisation des neurones à kisspeptine et des doses. Chez les humains, une étude épidémiologique rapporte une expression plus élevée de Kiss1 dans le placenta de paires mère-enfant vivant dans une ville de recyclage des déchets électroniques en Chine par rapport aux paires mère-enfant d'autres régions ; et cette augmentation de l'expression de Kiss1 a été positivement associée avec des concentrations plus élevées de BPA dans le sang de cordon ombilical (Xu et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la perturbation de la kisspeptine pourrait être un biomarqueur précoce de l'altération de la reproduction associée au BPA, même chez l'humain.

Beaucoup moins d'études font état de l'effet du BPA sur les neurones à RFRP-3. Une étude a montré que les rats femelles exposées en période prénatale à 50 μ g/kg de BPA présentent une diminution de l'expression du RFRP-3 et une réduction du nombre de contacts des fibres à RFRP-3 sur les neurones à GnRH, associées à une ouverture vaginale avancée (Losa-Ward *et al.*, 2012). Ces données suggèrent

que l'exposition prénatale au BPA peut avancer l'apparition de la puberté en diminuant les afférences inhibitrices des neurones à RFRP-3 sur les neurones à GnRH.

Le BPA peut perturber directement l'activité des neurones à GnRH, comme l'illustre une étude *in vitro* rapportant que de faibles concentrations de BPA inhibent le calcium intracellulaire sur des neurones à GnRH immatures isolés, probablement par le biais d'une action sur les canaux sodiques, potassiques ou calciques dépendants du voltage (Klenke *et al.*, 2016). Par ailleurs, le BPA peut également modifier les régulations épigénétiques du système GnRH au cours de la vie, bien que peu de données sont encore disponibles pour étayer cette hypothèse (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2021 pour revue).

En ce qui concerne l'hypophyse, l'exposition pendant le développement embryonnaire à de faibles doses de BPA augmente la prolifération cellulaire de l'hypophyse et le nombre de cellules gonadotropes à la naissance chez les souris femelles mais pas chez les mâles (Brannick *et al.*, 2012). La même équipe a rapporté qu'une exposition au BPA en période périnatale n'affectait pas le développement des cellules gonadotropes de l'hypophyse mais plutôt l'expression des cellules pituitaires à POMC impliquées dans la régulation de l'axe du stress (Eckstrum *et al.*, 2018). Ces études soulignent la différence d'effets du BPA selon les périodes développementales.

Le BPA peut aussi perturber la sensibilité du système hypothalamique au rétrocontrôle des hormones sexuelles, notamment en altérant l'expression hypothalamique des récepteurs aux œstrogènes dans l'hypothalamus médiobasal, l'aire pré-optique (Wolstenholme *et al.*, 2012 ; Arambula *et al.*, 2016 ; Mahoney et Padmanabhan, 2010 ; Monje *et al.*, 2007), l'AVPV (Monje *et al.*, 2009 ; Rebuli *et al.*, 2014 ; Cao *et al.*, 2012) et l'ARC (Monje *et al.*, 2010).

Enfin, l'altération du comportement maternel, un phénomène fréquemment rapporté chez les rongeurs exposés au BPA (Della Seta *et al.*, 2005 ; Palanza *et al.*, 2002 ; Boudalia *et al.*, 2014) pourrait induire des modifications à long-terme des centres hypothalamiques régulateurs de la reproduction chez la descendance. Ainsi Peña et coll. (2013) démontrent une expression différentielle des ER α et ER β distribués dans l'aire pré-optique de petits rats en fonction des soins apportés par leur mère durant les 10 premiers jours de vie.

c. Effets sur le métabolisme énergétique

Chez l'humain, les études épidémiologiques présentent majoritairement des associations positives entre l'exposition au BPA et l'incidence du diabète de type 2 (Lang *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2014, Song *et al.*, 2016), le risque d'obésité chez les jeunes enfants et les adolescents (Trasande *et al.*, 2012), et des indices de masse corporelle élevés chez l'adulte (Ning *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012). Il existe toutefois des données contradictoires ne montrant aucune association entre les concentrations urinaires de BPA et l'incidence de diabète de type 2 ou les indices d'obésité (Lakind *et al.*, 2012, 2014).

Des études observationnelles ont aussi été réalisées dans un contexte d'exposition prénatale au BPA. Les concentrations sériques ou urinaires de BPA chez la mère ont été positivement corrélées à un indice de masse corporelle plus faible chez les filles à 9 ans (Harley *et al.*, 2013) et à un risque plus élevé d'avoir un bébé petit pour son âge gestationnel dans plusieurs études (Chou *et al.*, 2011 ; Snidjer *et al.*, 2013 ; Miao *et al.*, 2011). Ces derniers résultats ne sont pas corroborés par les études menées par Lakind et coll. (2014) ou par Lee et coll. (2014).

Chez les rongeurs, le BPA induit des effets obésogènes sans équivoque puisque la majorité des études rendent compte d'un métabolisme énergétique lent et d'une perturbation de la signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques. En effet, l'exposition au BPA en période postnatale (à l'âge adulte), prénatale ou périnatale induit une augmentation du poids corporel (Mohgaddam *et al.*, 2015 ; Rubin *et al.*, 2001 ; Angle *et al.*, 2013) et de la masse du tissu adipeux blanc (Marmugi *et al.*, 2012 ; Angle *et al.*, 2013). Elle peut aussi être à l'origine d'une résistance à l'insuline dans les adipocytes, le foie et les muscles squelettiques (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006, 2010), d'une augmentation du glucose sanguin et d'une hypercholestérolémie (Mohgaddam *et al.*, 2015 ; Marmugi *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2014, Angle *et al.*, 2013).

Le BPA peut exercer ses effets sur le métabolisme énergétique par des modes d'action périphériques directs tels que la perturbation du métabolisme des acides gras et de l'adipogénèse dans le tissu adipeux blanc (Garcia-Arevalo *et al.*, 2014 ; Masuno *et al.*, 2005), l'induction de l'expression de gènes lipogéniques dans le foie (Marmugi *et al.*, 2012), la stimulation de la libération d'insuline par le pancréas (Soriano *et al.*, 2012) ainsi que la perturbation des voies de signalisation de l'insuline dans le foie et les muscles squelettiques (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006).

Au niveau central, l'influence du BPA sur le système de contrôle de l'homéostasie énergétique a été assez peu investiguée. Une étude suggère que le BPA augmente l'expression protéique de AgRP/NPY et diminue celle de POMC dans des cellules neuroprogénitrices hypothalamiques en culture (Desai *et al.*, 2018). À l'inverse, l'induction de l'expression de POMC par le BPA a été rapportée dans une autre étude *in vitro* démontrant un effet médié par les récepteurs PPARγ (Salehi *et al.*, 2019).

En conclusion, au cours des trois dernières décennies, des études ont mis en évidence que les PE tels que le BPA ont contaminé tous les milieux de l'environnement et peuvent agir à différents niveaux des systèmes neuroendocriniens pour perturber les fonctions de reproduction et de métabolisme énergétique. Étant donné qu'une synchronisation stricte des fonctions reproductives et énergétiques est cruciale pour que les animaux adaptent leur reproduction avec les cycles environnementaux, il est fondamental d'évaluer si les PE ont un impact sur les rythmes journaliers et saisonniers de la reproduction et du métabolisme énergétique.

III. Les perturbateurs endocriniens et les rythmes biologiques

1. L'horloge circadienne est une cible des PE

À notre connaissance, aucune étude épidémiologique n'a fait état de l'effet des PE sur les rythmes biologiques humains. Cependant, les femmes exposées au travail posté présentent des troubles de la reproduction communs à ceux des femmes exposées à certains PE, tels que des cycles ovariens irréguliers et un risque accru d'endométriose (Lawson *et al.*, 2011 ; Marino *et al.*, 2009 ; Sirohi *et al.*, 2021 ; Titus-Ernstoff *et al.*, 2006) ; ce qui laisse supposer que la pollution lumineuse et la pollution chimique pourraient avoir des cibles reproductives et/ou circadiennes communes.

Dans des modèles animaux, quelques études expérimentales ont démontré que les PE peuvent perturber les horloges et les rythmes centraux ou périphériques dans la physiologie de la reproduction.

Ainsi, l'exposition gestationnelle à 50 µg/kg/jour de BPA modifie l'architecture des NSC des souriceaux, avec une augmentation des neurones à AVP et une diminution des neurones exprimant la protéine Sox2, un régulateur transcriptionnel du gène de l'horloge *Per2* ; ce qui entraîne une perturbation durable de l'activité circadienne à long terme sur plusieurs générations (Nesan *et al.*, 2021). Ces auteurs ont suggéré que le BPA se lie aux récepteurs fœtaux des œstrogènes et des androgènes situés dans les progéniteurs hypothalamiques pour induire leur prolifération et leur différenciation neuronale.

Outre les NSC, d'autres horloges hypothalamiques peuvent être perturbées par les PE. Par exemple, l'exposition prénatale de rats mâles et femelles à de faibles doses de benzoate d'œstradiol et d'Aroclor 1221, un mélange de PCB œstrogéniques anciennement utilisé dans l'industrie, masculinise l'expression de Per2 et de Arntl dans l'AVPV des femelles exposées (Walker et al., 2014). Les auteurs suggèrent que la masculinisation du profil d'expression de Per2 et d'Arntl pourrait expliquer la perturbation de la cyclicité œstrale observée chez les femelles traitées (Walker et al., 2014). Dans une autre étude, Tischkau et coll. (2011) ont rapporté que le produit de combustion 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine (TCDD) modifie l'expression circadienne des gènes Bmal1 et Per2 dans l'ovaire de la souris, potentiellement via l'action d'un récepteur d'hydrocarbures aryliques, mais les conséquences de cette perturbation des rythmes circadiens ovariens n'ont pas été explorées. Certaines études menées sur le poisson-zèbre et d'autres poissons téléostéens portant sur l'impact reproductif des polluants aquatiques (œstrogènes synthétiques, progestatifs, effluents d'usines de pâte à papier) rapportent une perturbation de l'expression des gènes horloges en plus des effets sur la reproduction (Bottalico et Weljie, 2021 pour revue). Les mécanismes sous-jacents responsables de la perturbation de l'horloge induite par les PE ne sont pas encore compris, mais les PE pourraient perturber le rétrocontrôle hormonal sur les horloges circadiennes en agissant sur les récepteurs hormonaux (Bottalico et Weljie, 2021 pour revue).

2. Des perturbateurs endocriniens saisonniers ?

Dans leurs premières études, Leopold et coll. (1976) ont rapporté que des niveaux substantiels de phytoestrogènes dans la végétation consommée par les cailles sauvages de Californie corrèlent avec la diminution de leur reproduction annuelle. D'autres études ont confirmé que les phytoestrogènes inhibent la reproduction chez les animaux sauvages (Rochester *et al.*, 2009). D'un point de vue écologique, la détection de l'augmentation des concentrations de phytoestrogènes pendant les années arides pourrait être perçue comme un signal adaptatif permettant aux reproducteurs saisonniers de diminuer leur reproduction lorsque les ressources alimentaires sont insuffisantes (Rochester *et al.*, 2009). Une telle relation entre le signal végétal et la reproduction des oiseaux favorise le succès reproducteur de la population. Comme les phytoestrogènes partagent des signatures chimiques communes avec certains PE et se lient aux mêmes récepteurs, les composés imitant les phytoestrogènes pourraient inhiber la reproduction saisonnière des organismes, même si les conditions environnementales sont favorables.

Quelques études ont évalué l'impact de l'exposition aux PE sur la reproduction d'animaux physiologiquement saisonniers tels que les oiseaux, les poissons, les moutons et les rongeurs, mais sans tenir compte de la différence entre les périodes de reproduction et de quiescence de la reproduction (Hashem et al., 2018; Romanowicz et al., 2004; Yellon et al., 2000). Cependant, des études récentes ont rapporté que l'exposition du poisson zèbre et du médaka japonais à deux contaminants œstrogéniques aquatiques, le nonylphénol et le 17β-œstradiol, modifie l'expression de la vitellogénine1, un gène sensible aux œstrogènes, en réponse à l'augmentation de la température et de la photopériode (Jin et al., 2010, 2011). Une autre étude sur le campagnol roussâtre adulte a rapporté que l'exposition au 4-tert-octylphénol (OP) induit une altération structurelle et fonctionnelle des testicules chez les animaux adaptés à une photopériode longue, mais pas à une photopériode courte (Hejmej et al., 2011). D'autres études ont indiqué que l'OP modifie l'expression et la distribution des protéines de jonction testiculaires dans le testicule des animaux adaptés à une photopériode longue, mais pas à une photopériode courte, via un mécanisme médié par les ER (Hejmej et al., 2013). De même, l'OP a un effet dépendant de la photopériode longue sur les paramètres de motilité des spermatozoïdes de campagnol roussâtre in vitro (Kotula-Balak et al., 2014). Étant donné que les testicules du campagnol roussâtre adapté aux jours courts expriment moins de ERB (Bilinska et al., 2001), ils pourraient être moins sensibles, en photopériode courte, à l'action de l'OP médiée par les ER (Bilinska et al., 2001). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que la photopériode peut influencer la sensibilité des animaux à l'action des PE sur les fonctions reproductives chez les reproducteurs saisonniers.

Deux études sur les oiseaux ont rapporté que les phytoestrogènes peuvent également affecter la reproduction lors d'une transition photopériodique. Ainsi, les isoflavones de soja, administrées à 1% dans l'aliment, réduisent le développement testiculaire des cailles japonaises transférées d'une photopériode courte inhibitrice à une photopériode longue stimulatrice (Wilhelms *et al.*, 2006). De même, des oscines transférées en photopériode longue et nourris avec des aliments enrichis en isoflavones présentent un retard d'une semaine dans la croissance de la protubérance cloacale (indicatrice d'une diminution potentielle des androgènes circulants) et des concentrations plasmatiques de LH plus élevées, bien qu'il n'y ait pas d'effet significatif sur le poids des testicules à la fin de l'étude (Corbitt *et al.*, 2007). Ces effets subtils des phytoestrogènes sur le changement d'état de reproduction des oiseaux suggèrent que les PE peuvent perturber les cycles saisonniers de reproduction.

Par ailleurs, plusieurs éléments neuroendocriniens intervenant dans la régulation des rythmes physiologiques saisonniers, liés à la photopériode, pourraient être des cibles potentielles des PE, mais n'ont jamais été étudiés dans ce contexte. En effet, les PE pourraient exercer leurs effets sur :

- Le rétrocontrôle sexuel saisonnier : la rétroaction négative des stéroïdes sexuels joue un rôle important dans la réduction de la sécrétion de la GnRH et la sécrétion de gonadotrophines pendant l'anœstrus chez le mouton et pendant la période de non-reproduction chez le hamster (Legan *et al.*, 1977 ; Tamarkin *et al.*, 1976). De nombreux PE, tels que le BPA, peuvent mimer ou antagoniser l'action des stéroïdes sexuels et donc potentiellement perturber ces éléments de l'axe saisonnier.
- L'activité de la mélatonine : la durée de sécrétion nocturne de mélatonine par la glande pinéale orchestre l'intégration de la photopériode (Bartness *et al.*, 1993). Les effets des PE sur le système mélatoninergique ont été étudiés chez les poissons et les rongeurs, mais jamais dans un contexte saisonnier. En effet, les effets de PE tels que le DDT (Attia *et al.*, 1990), le parathion (Attia *et al.*, 1991a) ou des insecticides à base de carbamate (Attia *et al.*, 1991b) ont été testés de manière aiguë sur la synthèse de la mélatonine pendant la nuit mais pas sur la durée de la synthèse nocturne de mélatonine (à part une étude de Yellon et coll. en 2000). Or, c'est la durée nocturne de synthèse de mélatonine qui fournit le code endocrinien de la durée de la nuit et donc de la photopériode. Dans l'ensemble, ces études ont montré que les PE peuvent cibler le système mélatoninergique des rongeurs et des poissons. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'effet des PE sur l'intégration du système mélatoninergique chez les rongeurs exposés à différents commutateurs photopériodiques.

- Les hormones thyroïdiennes : la T3 relaie le signal de la mélatonine à l'hypothalamus pour synchroniser la reproduction saisonnière (Yoshimura, 2013). De nombreux PE ont été signalés comme ciblant le système des hormones thyroïdiennes de multiples façons (Calsolaro *et al.*, 2017). Par exemple, le BPA peut se se lier aux TR ou altérer la transcription médiée par les TR (Wetherill *et al.*, 2007 ; Moriyama *et al.*, 2002 ; Sheng *et al.*, 2012). D'autres PE, tels que le DEHP, peuvent modifier l'expression des TSH-R (Kim *et al.*, 2021 ; Sun *et al.*, 2022). Les métabolites de PCB hydroxylés modifient la liaison des hormones thyroïdiennes à leurs transporteurs sériques (Gutleb *et al.*, 2016 ; Meerts *et al.*, 2000). Aussi, les PE tels que les polybromodiphényléthers et les PCB modifient les activités des déiodinases (Kato *et al.*, 2004 ; Roberts *et al.*, 2015 ; Schnitzler *et al.*, 2011 ; Stapleton *et al.*, 2009). Enfin, certains PE peuvent perturber la capture de l'iodure dans la circulation sanguine, le transport cellulaire des hormones thyroïdiennes et la sulfatation ou la glucuronidation des hormones thyroïdiennes (Gutleb *et al.*, 2016).
- Les neuropeptides hypothalamiques : les activités des neurones à kisspeptine, RFRP-3, POMC et à somatostatine sont critiques pour synchroniser le message thyroïdien saisonnier avec la reproduction et le métabolisme énergétique. Or, nous avons vu que la kisspeptine, le RFRP-3 et la POMC pouvaient être des cibles des effets du BPA (partie II.4.b).

Ainsi, les PE ont le potentiel d'altérer plusieurs éléments du système d'intégration du message saisonnier. Pourtant, à ce jour, aucune étude n'a réellement évalué leur impact sur l'intégration centrale de la photopériode et trop peu ont évalué leur effet sur l'adaptation des réponses physiologiques à des changements de photopériode.

Objectifs et projets de recherche

Au vu des effets et des cibles d'action connus du BPA, il est probable que ce PE puisse perturber l'intégration centrale du message photopériodique et les adaptations reproductives et métaboliques des espèces saisonnières. En effet :

- Le BPA a des actions oestrogéniques et anti-thyroïdiennes qui pourraient rentrer en conflit avec le rétrocontrôle sexuel saisonnier et le rôle central de la T3 hypothalamique dans la synchronisation saisonnière de la physiologie ;
- ii. Le BPA perturbe l'activité des neurones à kisspeptine, RFRP-3 et POMC dont dépend en partie la synchronisation de l'axe gonadotrope et de la gestion énergétique avec les saisons *via* la T3 hypothalamique ;
- iii. Le BPA induit un profil obésogène qui peut empêcher l'augmentation de la dépense énergétique nécessaire à la gestion de l'énergie en photopériode courte ;
- iv. Le BPA altère la physiologie de l'appareil reproducteur, qui participe à la mise en place de la réponse reproductrice saisonnière ;
- v. Le BPA peut influencer l'organisation des systèmes neuroendocriniens lorsque les individus y sont exposés en période développementale, ce qui suggère qu'une exposition au BPA en début de vie pourrait avoir des effets sur les mécanismes centraux d'intégration des saisons à longterme.

Sur la base de ces observations, mes travaux de thèse ont visé à :

- i. évaluer les effets d'une exposition au BPA lors de la transition 1) d'une photopériode longue
 (PL) à une photopériode courte (PC); 2) d'une PC à une PL sur l'adaptation des réponses reproductrices et métaboliques;
- ii. déterminer, en cas de réponses physiologiques inadaptées, les cibles du BPA dans le système neuroendocrinien d'intégration du message photopériodique ;
- iii. évaluer les effets d'une exposition au BPA en période lactationnelle et gestationnelle sur les capacités à intégrer le message saisonnier à long terme ;
- iv. caractériser les effets d'une exposition au BPA sur la fertilité, le comportement maternel, la croissance et la puberté de notre modèle de rongeur saisonnier, le hamster djungarien ;
- v. évaluer, dans ce contexte, les impacts de l'exposition au BPA dépendants du sexe.

Ces objectifs ont mené à la réalisation de deux projets de recherche :

Projet 1 : Évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA au cours de changements photopériodiques chez le hamster djungarien

Projet 2 : Évaluation des effets somato-endocriniens d'une exposition au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle au cours du cycle biologique du hamster djungarien.

Projet 1 : Evaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA au cours de changements photopériodiques chez le hamster djungarien

Matériel et méthodes
1. <u>Animaux</u>

Ce projet de recherche a fait l'objet d'une réflexion éthique autour de la démarche expérimentale utilisant des animaux. Une demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques a été déposée, puis validée par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg et par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS#22595-2019102317455140).

L'étude a été réalisée sur des hamsters djungariens (*Phodopus sungorus*) mâles et femelles nés et élevés au sein du Chronobiotron (UMS 3415, Strasbourg), et âgés en moyenne de 6 mois au début des expériences. Les hamsters étaient initialement regroupés par 3 ou 4 dans des cages de type II L et identifiables par des puces sous-cutanées (1,4x8 mm) lisibles par un lecteur RFID (Biolog-Tiny). Chaque cage était enrichie en coton de nidation, bâtonnet à ronger et tunnel en acier inoxydable. L'eau et la nourriture étaient disponibles *ad libitum*. La température dans les pièces était de $22^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, la lumière était allumée pendant la période diurne et passait en lumière rouge en période nocturne. De la naissance au début des expériences, les animaux ont été hébergés dans une pièce avec une durée d'éclairement quotidienne (photopériode) de 16h de lumière/8h d'obscurité.

Plusieurs mesures ont été prises dans l'hébergement des hamsters afin de minimiser leur exposition aux perturbateurs endocriniens environnants. L'ensemble des hamsters, y compris les couples reproducteurs de l'élevage, ont été placés dans des cages en polyphénylsulfone (PPSU) (Tecniplast) équipées de biberons en verre. À l'inverse du polycarbonate qui compose classiquement les cages pour rongeurs, le PPSU ne contient pas de BPA mais est un polymère de bisphénol S et 4,4'-biphénol. Il présente une très haute résistance thermique permettant de limiter le relargage des bisphénols à la suite des cycles répétés d'autoclavage des cages. Dans l'environnement d'une animalerie, des xénoœstrogènes peuvent aussi être présents sous différentes formes et peuvent masquer les effets oestrogéniques potentiellement induits par l'exposition au BPA (Thigpen *et al.*, 2013). De ce fait, nous avons veillé à utiliser de la frisure de peuplier exempte de myco-oestrogènes dans les cages. Finalement, les animaux en reproduction et en croissance ont eu une nourriture complète végétale à faible teneur en phyto-œstrogènes (SAFE® 150), puis ont été habitués à partir du sevrage à un régime alimentaire de maintien, également faible en phyto-œstrogènes (7011P, Altromin International).

2. <u>Préparation de la nourriture pour l'exposition au BPA par voie alimentaire</u>

Les animaux ont été exposés au BPA (#239658, Lot #MKCD7508, Sigma Aldrich) ou à l'éthanol (véhicule seul) par incorporation dans leur nourriture préparée chaque semaine.

Chaque semaine, 25 mg de BPA pur ont été pesés sur une balance de précision et dissous dans 1 ml d'éthanol 100%. Le volume de cette solution-mère de 25 mg/ml de BPA ou d'éthanol 100%, à

incorporer dans la nourriture des animaux, a été calculé afin de reconstituer un régime apportant 5, 50, ou 500 μ g/kg/jour de BPA ou 0,02% d'éthanol pour le groupe contrôle pendant 7 jours. Le calcul de ce volume a tenu compte du poids corporel moyen, de la variation moyenne de la prise alimentaire des animaux, mesurés pour chaque animal et chaque cage la semaine précédente (facteur de correction f), et du nombre d'animaux par groupe d'exposition. Le calcul a été réalisé de la façon suivante :

Volume de la solution – mère (
$$\mu l$$
) = $\frac{(dose(\mu g) x poids corporel(kg)) x n x 7 x f}{25 000(\mu g)} x 1000$

Avec :

- dose = 5, 50 ou 500 $\mu g de BPA$
- *n* = nombre d'animaux dans le groupe
- $7 = nombre \ de \ jours$
- f = facteur de correction de la prise alimentaire

Nous avons distribué aux animaux une quantité d'aliments estimée supérieure à celle qui était réellement consommée chaque semaine, ainsi nous avons inclus dans le calcul du volume de BPA un facteur de correction moyen de la prise alimentaire (f). Pour calculer le f pour chaque groupe, nous avons divisé la quantité moyenne de croquettes consommée estimée (50g/animal) par la quantité moyenne de croquettes réellement consommées la semaine précédente.

Ce volume de BPA ou d'éthanol calculé a été ajouté à de l'eau potable pour un volume final de 40 ml, sous agitation pendant 15 min. Ce mélange eau/BPA a alors été pétri avec 60 g de poudre de croquettes à faible teneur en phyto-œstrogènes dans un mixeur pendant 20 min. La pâte a été étirée en longs rubans de 1 cm de diamètre qui ont été taillés en morceaux de 3 cm environ. Les croquettes obtenues ont été déshydratées à l'étuve à 37°C toute une nuit. Le matériel utilisé dans la préparation des aliments a été majoritairement composé de verrerie et d'acier inoxydable, lavé à l'éthanol 100% et à l'eau ultrapure. Un équipement distinct a été utilisé pour préparer les croquettes destinées aux animaux contrôles.

L'exposition alimentaire au BPA est un mode d'administration peu invasif pour les animaux et aussi plus représentatif de l'exposition environnementale au BPA. Cependant, il implique un changement de régime alimentaire pour les hamsters. Ainsi, des expériences préliminaires ont permis de valider que l'apport de croquettes non commerciales reconstituées au laboratoire n'impactait pas la prise alimentaire et le poids corporel des hamsters djungariens, une fois qu'ils étaient progressivement adaptés à ce régime alimentaire. Avant le début de chaque expérience, les hamsters ont donc été préalablement habitués à ce régime alimentaire pendant au moins 6 semaines.

3. <u>Protocoles expérimentaux</u>

a. Expérience 1 : évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA pendant l'intégration d'une photopériode courte

Le but de cette expérience a été d'évaluer les impacts d'une exposition orale à différentes doses de BPA sur l'intégration neuroendocrinienne du message inhibiteur de la PC (figure 31). Un total de 38 mâles et 41 femelles ont été transférés de leur PL (16h de lumière/8h d'obscurité) de stabulation à une PC (8h de lumière/16h d'obscurité) pour 10 semaines. Pendant cette période, les animaux ont été exposés par voie alimentaire à 5, 50, 500 μ g/kg/jour de BPA ou 0,02 % d'éthanol (n=5-8 hamsters/groupe). En parallèle, un groupe de 10 mâles et de 8 femelles a été maintenu en PL et exposé à 0,02 % d'éthanol afin de servir de groupe de référence à reproduction active et haute activité métabolique. Tous les animaux ont été mis à mort à l'issue des 10 semaines.

b. Expérience 2 : évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA pendant l'intégration d'une photopériode longue

Les effets d'une exposition au BPA sur l'intégration neuroendocrinienne du message activateur de la PL (figure 31) ont aussi été investigués. Un total de 55 mâles et 62 femelles, adaptés depuis leur naissance à une PL, ont été transférés en PC pendant 11 semaines afin d'induire une inactivation de leur fonction reproductrice et une réduction de leur activité métabolique. Les hamsters ont ensuite été transférés à nouveau en PL pendant 10 semaines. Pendant cette période, ils ont été exposés à 5, 500 µg/kg/jour de BPA ou 0,02% d'éthanol (n=7-12 hamsters/groupe). Afin d'apporter des critères d'évaluation longitudinaux à cette expérience, les femelles ont pu être séparées en deux groupes : un groupe de femelles exposées ou non au BPA a été mis à mort après 5 semaines de retour en PL, le second a été mis à mort après 10 semaines de retour en PL. Les mâles auraient été insuffisamment nombreux par groupe expérimental si leurs tissus avaient été prélevés à deux moments différents du protocole photopériodique. Ils ont alors tous été mis à mort après 10 semaines de PL.



Figure 32 : Protocoles expérimentaux.

Protocoles expérimentaux évaluant les impacts neuroendocriniens de l'exposition au BPA sur l'intégration de la photopériode courte (A) ou de la photopériode longue (B) des hamsters djungariens. Plusieurs analyses somatiques, endocrines et génétiques ont été réalisées après la mise à mort des animaux (C). PC=photopériode courte ; PL=photopériode longue

Pour ces deux expériences, le poids corporel de chaque animal et la consommation d'aliments dans chaque cage ont été suivis chaque semaine. Toutes les deux à trois semaines, les variations du pelage des hamsters ont été observées à l'aide de critères d'observation définis par Figala (1973), détaillés dans la partie *4. Suivis et analyses longitudinales*.

c. Critères d'exclusion

Il arrive qu'un petit effectif de hamsters djungariens exposés à une PC maintiennent un état reproducteur actif, un poids corporel stable et un pelage d'été (Gorman et Zucker, 1997). Ainsi, dans nos expériences, il a été important d'identifier ces animaux non-répondants à la PC et de les exclure des analyses afin d'éviter une mauvaise interprétation des données obtenues.

Pour cela, à partir de critères existants dans la littérature (Butler *et al.*, 2007 ; Greives *et al.*, 2008), j'ai considéré que les hamsters étaient photo non-répondants à la PC s'ils présentaient au moins deux des trois critères suivants à l'issue des 10 semaines de PC :

- Une perte de poids inférieure ou égale à 11% du poids corporel pour les mâles et 17,5% pour les femelles (par rapport au poids corporel basal en PL);
- 2) Un poids testiculaire ou utérin+ovaires supérieur ou égal à 0,1g ;
- 3) Un score de pelage inférieur ou égale à 2.

La PC induit une perte de poids corporel physiologique notable chez les hamsters djungariens. Cependant, des fluctuations de poids corporel peuvent aussi être causées par des facteurs non photopériodiques tels que l'âge, la qualité de l'alimentation, l'effet des manipulations répétées des animaux (Gorman et Zucker, 1995 ; Butler *et al.*, 2007). Ainsi, pour attribuer la perte de poids corporel à l'intégration physiologique de la PC, des seuils de perte de poids corporel ont été définis sur la base des variations de poids corporel d'animaux contrôles maintenus en PL. Pour chaque animal maintenu en PL, nous avons calculé son pourcentage de poids corporel perdu entre la première et dixième semaine de PL (les hamsters en PL ont été suivis en même temps que ceux transférés en PC lors de l'expérience 1) puis, pour chaque sexe, nous avons calculé les moyennes de pourcentage de perte de poids corporel et les déviations standards. Le seuil a été calculé selon la formule suivante :

Seuil perte de poids (%) = Perte de poids corporel moyenne en PL (%) + (3 x déviation standard)

Si les animaux transférés en PC montraient des pertes de poids corporel supérieures à ce seuil à l'issue des 10 semaines, leur réponse en terme de perte de poids corporel a été considérée comme induite par la PC. Sur les deux expériences réalisées, 5 animaux, sur les 148 animaux analysés, ont été identifiés comme photo non-répondants avec des critères d'exclusion précisés dans le tableau 2. A noter que pour l'expérience 2, la pesée des organes reproducteurs n'a pas pu être obtenue après 10 semaines de PC car les animaux étaient ensuite retransférés en PL et les organes reproducteurs n'étaient analysés qu'après 5 ou 10 semaines de retour en PL.

Photo non-	Femelle 1	Femelle 2	Mâle 1	Mâle 2	Mâle 3
répondants	expérience 1	expérience 2	expérience 1	expérience 1	expérience 2
Exposition	Véhicule	5 μg BPA/kg/jour	Véhicule	50 μg BPA/kg/jour	Véhicule
Perte de poids corporel en PC (%)	+ 53%	+ 2%	-16.7%	+17.5%	+7.7%
Poids des organes reproducteurs (mg)	191.5	-	163.2	148.4	-
Pelage (stade)	2	1.5	2	2.5	1

 Tableau 2 : Hamsters catégorisés comme photo non-répondants et exclus des analyses des expériences 1 et 2.

PC = photopériode courte.

4. <u>Suivis et analyses longitudinales</u>

a. Poids corporel

Les évolutions des poids corporel mesurés au cours des 10 semaines de PC (expérience 1) et PL (expérience 2) ont été modélisées par des régressions non linéaires selon Butler et coll. (2007), afin de déterminer les vitesses de perte/gain de poids corporel et les temps de transition vers les phénotypes de poids corporel de type PC ou PL (figure 32). Pour chaque individu, les mesures de poids corporel au cours des 10 semaines de PC ou PL ont été normalisées puis modélisées par une équation de Hill générant des courbes sigmoïdales de type dose-réponse inhibitrices (expérience 1) ou activatrices (expérience 2). La qualité des modélisations a été calculée par des coefficients de détermination (R²) s'élevant en moyenne à 0,91 pour l'expérience 1 et à 0,85 pour l'expérience 2. Les dérivées secondes et les pentes de Hill obtenues à partir des fonctions modélisées ont permis de déterminer, respectivement, les accélérations et les vitesses de variation de poids corporel. La durée avec laquelle les hamsters commencent à perdre ou gagner du poids corporel correspondent aux points d'inflexion des courbes de poids corporel : 1) soit au point où l'accélération, donc la dérivée seconde, est nulle lorsque les animaux ont perdu du poids en PC ; 2) soit au point où l'accélération, donc la dérivée seconde, est maximale quand les animaux ont regagné du poids en PL (Butler *et al.*, 2007).



Figure 33 : Exemples d'analyses réalisées.

Exemples de modélisation par régression non linéaire et d'analyse de l'évolution de poids corporels individuels au cours de la photopériode courte (PC, expérience 1) ou de la photopériode longue (PL, expérience 2).

b. Prise alimentaire

La nourriture consommée dans chaque cage a été mesurée chaque semaine puis ramenée à une consommation individuelle journalière. L'indice d'efficacité alimentaire cumulé au cours des 10 semaines de PC ou PL a été calculé pour chaque semaine avec la formule suivante :

Indice d'efficacité alimentaire cumulé =
$$\frac{gain \ de \ poids \ corporel \ cumulé \ (g)}{prise \ alimentaire \ cumulé \ (g/animal/jour)}$$

Pour les deux expériences, les indices d'efficacité alimentaire basale ont aussi été mesurés avant l'exposition au BPA pour vérifier que les éventuelles différences d'efficacité alimentaire observées entre groupes étaient attribuables aux conditions d'exposition au BPA et non causées par l'hétérogénéité des profils de consommation des animaux répartis dans les différents groupes.

c. Pelage

Le hamster djungarien arbore un pelage brun foncé en PL/été avec la présence d'une bande médiane et deux bandes latérales dorsales brun foncé et de 4 bandes transversales brun foncé sur les flancs qui descendent vers le ventre. Quand le hamster s'adapte à la PC/hiver son pelage blanchit progressivement et les bandes dorsales et transversales disparaissent (figure 33).

Figala et coll (1973) ont décrit de façon très précise les variations saisonnières du pelage de hamsters djungariens maintenus sous un éclairage naturel. Ils ont déterminé six stades de changement

du pelage, allant de la robe d'été en stade 1 au manteau d'hiver blanc et épais en stade 6 (tableau 3). Toutes les deux à trois semaines, j'ai utilisé les critères de Figala et coll. pour caractériser l'évolution du pelage des hamsters djungariens dans les expériences 1 et 2.



Figure 34 : Les variations saisonnières de pelage du hamster djungarien. (A) Illustrations de Figala *et al.*, 1973 (B) Photographie modifiée d'après Duncan et Goldman, 1984.

Stades	Visage	Ventre	Dos	Bande médiane dorsale	Bandes transversales des flancs	Type de poils
Stade 1	Gris, brun foncé	Blanc sale	Brun foncé	Tout le long du dos	Descendantes vers le ventre	Fin
Stade 2	Brun clair	Blanc sale	Brun foncé Tâches claires aux épaules	Rétrécissement dans la région caudale	Présentes sur le dos, moins descendantes vers le ventre	Fin
Stade 3	Gris clair	Blanc	Brun foncé Tâches claires aux épaules et en région sacrée	Rétrécissement dans la région caudale	Présentes sur le dos, moins descendantes vers le ventre	Épais aux pattes
Stade 4	Blanchâtre	Blanc	Gris à marron clair Tâches claires au niveau central, grande zone claire sacrale	Rétrécissement dans la région caudale	Rétrécissement dans la région sacrée	Épais
Stade 5	Blanchâtre	Blanc	Gris à marron clair sur l'avant du dos Blanchâtre caudalement	Absente dans la région caudale	Absente	Épais
Stade 6	Blanchâtre	Blanc	Blanc	Absente	Absente	Épais

Tableau 3 : Les six stades de changement saisonnier du pelage du hamster Djungarien. D'après Figala *et al.*, 1973.

5. <u>Mise à mort et prélèvements des tissus</u>

À l'issue des 10 semaines de PC ou de PL, les hamsters ont été mis à mort en début de phase diurne (entre 1 à 4 h après l'allumage de la lumière). Dans le cas des femelles, des frottis vaginaux ont été réalisés le matin afin d'observer la cytologie vaginale au microscope et de ne sacrifier que les femelles en stade de diestrus 1 ou 2. Les hamsters ont été profondément anesthésiés par injection intrapéritonéale de 40 mg/kg d'un mélange de tilétamine et zolazépam (Zoletil50) et 10 mg/kg de xylazine (Rompun). La profondeur de l'anesthésie a été vérifiée en testant l'absence de réflexe de retrait de la patte et de la paupière suite à une forte pression. Une anesthésie locale de la zone thoracique a été réalisée par injection sous-cutanée de 4 mg/kg de lidocaïne (Lurocaine) le long de la cage thoracique. Les hamsters ont été pesés puis leur taille a été mesurée à la règle. Après thoracotomie, environ 1 ml de sang a été prélevé par ponction intracardiaque à la seringue puis, immédiatement, une goutte de sang a été déposée sur une bandelette lue par un lecteur de glycémie (AccuCheck Performa, Roche). Le reste du sang a été collecté dans un tube hépariné, gardé sur glace, puis centrifugé ultérieurement à 2500 rpm pendant 30 min à 4°C pour en récupérer le plasma. Le lobe droit du foie a été prélevé, rincé dans une solution de NaCl à 0,9% et collecté dans un tube immédiatement plongé dans de l'azote liquide.

Une seringue rodée a été insérée à la base du ventricule gauche jusque dans l'aorte et une incision a été réalisée dans l'oreillette droite afin de permettre la circulation des solutions de rinçage (10 ml de tampon phosphate salin (PBS)) et de fixation (25 ml d'une solution de périodate-lysineparaformaldéhyde (PLP)) dans l'ensemble de l'appareil circulatoire. Après la perfusion, l'ensemble larynx-trachée-œsophage contenant la glande thyroïde a été collecté dans une solution de Bouin pour une fixation supplémentaire de 48 h. Chaque animal a été guillotiné, la boîte crânienne a été dégagée de la peau et des yeux et conservée dans une solution de PLP pendant 12 h. Le cerveau a été disséqué de la boîte crânienne environ 4 h après puis remis dans la solution de PLP pour 8 h supplémentaires de post-fixation. Finalement, les testicules, les vésicules séminales, le gras péri-testiculaire et l'ensemble utérus-trompes-ovaires ont été prélevés, disséqués puis pesés sur une balance de précision. Les testicules et les utérus ont été collectés dans une solution de Bouin pour une fixation prolongée de 48 h.

6. Déshydratation et stockage des tissus prélevés

Après 12 h de fixation, les cerveaux ont été rincés toute une nuit, à température ambiante, dans une solution d'éthanol 50%, puis ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes : 2×1 h éthanol 70%, 2×1 h éthanol 95%, 2×1 h éthoxyéthanol, puis 24 h de butanol avant un stockage de longue durée dans le butanol à +4°C. Les testicules, utérus et glande thyroïde fixés pendant 48 h ont ensuite été rincés au moins 5 fois à l'eau de ville avant d'être déshydratés par des bains d'alcool et stockés dans du butanol selon le même procédé que les cerveaux. Les plasmas et les foies ont été stockés à -80°C.

7. <u>Préparation des cerveaux : enrobage, coupe, montage sur lames</u>

a. Enrobage

Les cerveaux ont été taillés à la base du chiasma optique, puis enrobés en blocs de polyéthylène glycol (PEG, ThermoFisher Scientific). Dépendamment du poids moléculaire du polymère, ce milieu d'enrobage permet de couper les tissus au microtome en fines sections, de 2 à 40 μ m d'épaisseur, et garantit une très bonne qualité immunologique et histologique (Klosen *et al.*, 1993). Les cerveaux ont été incubés dans une solution de PEG de poids moléculaire 1000, pendant au moins 6 h à 50°C, jusqu'à ce que l'infiltration complète du milieu d'enrobage dans le tissu fasse couler les cerveaux au fond des tubes. Ensuite, ils ont été incubés dans un mélange de 50% de PEG 1000 et 50% de PEG 1500 toute une nuit à 50°C et sous vide, pour éviter l'incorporation de bulles dans le tissu. La solution a été changée le lendemain, à pression atmosphérique, pendant au moins 2 h. Enfin, les cerveaux ont été déposés à la verticale dans des moules d'enrobage préalablement remplis d'une solution de 5% de PEG 1000 et 95% de PEG 1500 pendant 1 h à 50°C. Les moules ont été sortis du four afin que les blocs de PEG se solidifient à température ambiante.

b. Coupe des cerveaux au microtome

Les blocs de cerveaux ont été coupés à l'aide d'un microtome (Leica, RM2245) en sections épaisses de 10 μ m, depuis l'aire pré-optique de l'hypothalamus antérieur (bregma -0,58) jusqu'à l'apparition de la décussation rétro-mamillaire marquant la disparition du noyau arqué hypothalamique (bregma -2,92). Les rubans de coupes tissulaires ont été déposés dans des boîtes cartonnées conservées dans une pièce régulée en humidité et en température (25% d'humidité ± 10%, 21°C ± 1°C).

c. Montage des coupes sur lame

Pour chaque animal, j'ai réalisé 10 séries de lames comprenant chacune 16 coupes réparties sur toute la longueur rostro-caudales de l'hypothalamus. À partir d'une coupe située au niveau du récessus mamillaire du 3^{ème} ventricule correspondant à la fin de l'hypothalamus (bregma -2,80), j'ai sélectionné une coupe sur dix dans le sens caudo-rostral jusqu'au début de l'aire préoptique. Les 16 coupes ont été montées sur lames (SuperFrost®Plus, Menzel Gläser, ThermoFisher Scientific) dans un milieu d'eau ultrapure. Les lames ont été séchées 20 min à 50°C puis stockées à -80°C pour les analyses par hybridation *in situ* ou dans un milieu de tampon tris salin (TBS) 1X et azide de sodium (NaN₃) à 0,02% à 4°C pour les analyses immunohistochimiques.

Chaque lame contient une série de coupes prélevées dans tout l'hypothalamus d'un seul et unique hamster. Toutes les lames des animaux appartenant au même protocole expérimental ont été traitées en même temps. Note : Lorsque les températures d'incubation, rinçage, centrifugation n'ont pas été indiquées dans les descriptions suivantes des étapes des marquages histologiques et dosages plasmatiques, cela signifie que l'étape a été réalisée à température ambiante.

8. <u>Hybridation *in situ* non-radioactive</u>

a. Principe

Des hybridations *in situ* (HIS) non radioactives sur lames ont été réalisées afin de mettre en évidence la présence d'ARNm d'intérêts sur les coupes histologiques de cerveaux puis de semiquantifier les ARNm détectés par analyse d'image. Des séquences d'ARNm complémentaires aux séquences cibles, appelées ribosondes, ont été marquées avec un haptène (petite molécule à haute antigénicité) sur les bases uridines. L'objectif est d'hybrider les deux séquences mono-brins complémentaires (endogène et ribosonde) et de révéler les hybrides double-brins obtenus en détectant par immunohistochimie (IHC) les haptènes des sondes hybridées (figure 34). L'HIS nécessite de synthétiser les ribosondes, pré-traiter les lames pour favoriser l'hybridation des ribosondes sur les séquences cibles, éliminer les hybrides non spécifiques et les ribosondes marquées non hybridées par des rinçages stringents et détecter la présence des haptènes par IHC.

b. Synthèse des ribosondes marquées aux haptènes

Des amplicons d'ADN des gènes codant pour $TSH\beta$, Dio2, Dio3, POMC, somatostatine et RFRP ont été clonés dans des plasmides incorporés dans des bactéries. Les plasmides recombinants ont été extraits et la présence des séquences d'ADN amplifiées a été validée par séquençage. Les plasmides ont été linéarisés en fonction du sens de transcription souhaité, afin d'obtenir des plasmides porteur d'une séquence promotrice permettant une transcription en ARNm anti-sens ou sens. Ces étapes avaient été précédemment réalisées par le Dr Paul Klosen.

Pour synthétiser une ribosonde, une ARN polymérase a transcrit l'insert en ARNm à partir de nucléotides marqués à la digoxigénine ou à la fluorescéine sur les bases uridines. Pour cela, 1 µg/µl de plasmide linéarisé anti-sens a été incubé pendant 2 h à 37°C avec 4 µl de tampon de transcription (#600110-32, Stratagène), 2 µl d'uridine triphosphates (1X) marqués à la digoxigénine ou à la fluorescéine (Roche) et 1 µl d'ARN polymérase (50 U/µl, détails dans le tableau 4), complété à l'eau ultrapure pour un volume final de 20 µl. Les ribosondes *TSH* β , *Dio2*, *Dio3*, *POMC* et *RFRP* ont été marqués à la digoxigénine et la ribosonde somatostatine a été marquée à la fluorescéine. Un µl de DNAse sans RNAse (1µg/µl) a été ajouté pour 15 min supplémentaires d'incubation à 37°C afin de dégrader la matrice d'ADN restante. Ensuite, la ribosonde formée a été précipitée en ajoutant 3 µl d'ARN de transfert de levure (10 mg/ml), 3 µl de chlorure de lithium (4 M) et 70 µl d'éthanol 100%, pendant toute

la nuit à -20°C. La ribosonde a été extraite par un cycle de centrifugation à 13400 rpm pendant 45 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 150 μ l d'éthanol 100%, pour une nouvelle centrifugation à température ambiante, pendant 15 min à 13400 rpm. Cette étape a été répétée 3 fois. Finalement le culot a été séché à l'air libre pendant 5 min puis resuspendu dans 100 μ l d'eau ultrapure pendant 30 min à 37°C. Les ribosondes ont toutes été testées et vérifiées par HIS au préalable sur des tissus de hamsters djungariens. Les ribosondes ont été stockées à -20°C.

Gène	Espèce	Longueur (nucléotides)	Ribosonde (sens – haptène)	ARN polymérase
TSHβ	Rattus norvegicus	365	AS - DIG	T3 (Fermentas)
Dio2	Phodopus sungorus	725	AS - DIG	SP6 (Fermentas)
Dio3	Phodopus sungorus	1147	AS - DIG	SP6 (Fermentas)
RFRP	Phodopus sungorus	440	AS - DIG	T7 (Agilent)
Proopiomelano cortine	Rattus norvegicus	932	AS - DIG	T7 (Agilent)
Somatostatine	Rattus norvegicus	384	AS - FLUO	T7 (Agilent)

Tableau 4 : Ribosondes utilisées pour l'hybridation in situ.

AS = anti-sens, DIG = digoxigénine, FLUO = fluorescéine.

c. Hybridation *in situ* : protocole standard

Les HIS ont été réalisées dans des conditions limitant la contamination aux RNases, avec un matériel uniquement destiné aux HIS (paillasse, fours, solutions) et une verrerie stérilisée.

i. <u>Pré-traitement : préparation des sections et des ribosondes pour l'hybridation</u>

Les lames avec les coupes sériées ont été immédiatement séchées à 50°C pendant 15 min après leur sortie du congélateur à -80°C. Les coupes ont été post-fixées 5 min avec une solution de formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate 0,1 M puis rincées avec du PBS 1X (3x5 min). Les tissus ont été perméabilisés en incubant les lames dans une solution de 0,5 μ g/ml de protéinase K (PK, Roche) dans du PBS 1X pendant 30 min à 37°C. La réaction enzymatique a été arrêtée en incubant les coupes dans une solution froide de formaldéhyde 2% dans du tampon phosphate pendant 5 min sur glace.

Les coupes ont été rincées avec du PBS 1X et 0,01% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC), un agent inactivateur des RNases (3x5 min). Le tissu des coupes a été acétylé dans un bain de 100 mM de triéthanolamine et 0,25% d'acide acétique pendant 10 min puis 0,25% d'acide acétique ont été ajoutés

dans le bain pour 10 min supplémentaires. Les coupes ont été rincées avec du PBS 1X et 0,01% de DEPC (2x5 min).

ii. Hybridation : formation d'hybrides spécifiques

Les sections ont été préincubées dans une solution de tampon citrate-sodium (SSC) 5X, tween 20 à 0,05% et DEPC à 0,01% (2x5 min). Les ribosondes ont été diluées à 1/100 dans un tampon d'hybridation dont la composition est décrite dans le tableau 5, dénaturées à 90°C pendant 10 min puis immédiatement transférées sur glace pour éviter aux brins séparés de la ribosonde de s'hybrider de nouveau et pour limiter les pliements des monobrins. Un volume de 100 µl de ribosonde diluée a été appliqué sur chaque lame qui a ensuite été recouverte d'une lamelle pré-traitée contre les RNases. Les lames ont été placées dans des chambres humides hermétiques, à 54°C (*Dio2*) ou 60°C (*TSH* β , *Dio3*, *RFRP*, *Somatostatine*, *POMC*) pour 36 h d'hybridation.

iii. <u>Stringence : élimination des ribosondes en excès et des hybrides non</u> spécifiques

Les coupes ont été rincées dans une solution de SSC 5X et tween 20 à 0,05% pour enlever la solution restante de ribosondes. Les lames ont été incubées dans 6 bains successifs d'une solution de stringence constituée de SSC 0,1X et tween 20 à 0,05% à 72°C pour 10 min à chaque bain.

iv. Détection des hybrides : révélation des ribosondes marquées hybridées par IHC

Les lames ont été préincubées dans une solution de tampon A-DIG 1X et tween 20 à 0,05% (2x5 min). J'ai dessiné un contour hydrophobe autour des coupes avec un crayon PAP PEN (Kisker, Dutscher group) afin de pouvoir incuber les coupes dans 300 μ l de solution de blocage pour chaque lame, pendant au moins 1 h. Sur chaque lame, j'ai appliqué 350 μ l d'anticorps anti-digoxigénine (1/5000, Roche) couplé à l'enzyme phosphatase alcaline, toute la nuit en chambre humide. Les lames ont été rincées dans une solution de tampon A-DIG 1X et tween 20 à 0,05% (3x10 min), puis ont été rincées dans une solution de tampon Tris salin 1X à pH 9,5 (AP) (2x5 min). L'activité phosphatase alcaline a été révélée en incubant les lames dans une solution de tampon AP contenant 330 μ g/ml de nitroblue tetrazolium (NBT, Roche) et 165 μ g/ml de bromo-chloro-indolyl phosphate (BCIP, ThermoScientific) pendant une durée (entre 2 et 24 h) déterminée pour chacune des ribosondes. Les lames ont été rincées abondamment à l'eau de ville afin d'arrêter la réaction et éliminer les restes de la solution de révélation. Les coupes ont été recouvertes d'un milieu de pré-montage aqueux (Crystal Mount, Sigma) afin de préserver les marquages des chromogènes, puis laissées à sécher pendant au moins 24 h.

Enfin, les lames ont été incubées dans du toluène (2x10 min) puis des lamelles ont été collées à l'Eukitt® (Sigma-Aldrich) sur les coupes pour préserver le marquage du tissu.

Etapes	Solutions	Fonctions			
Pré-traitement	<i>Post-fixation</i> (PB 100 mM, formaldéhyde 2% ou 4%)	Le formaldéhyde fixe le tissu, prévient sa désintégration et inactive les RNases.			
	<i>Perméabilisation</i> (PBS 1X, protéinase K 0,5- 1 μg/ml)	La protéinase K digère les protéines du tissu et favorise la pénétration des ribosondes dans le tissu.			
	<i>Acétylation</i> (triéthanolamine 100 mM, acide acétique 0,25%)	L'acétylation des groupes aminés chargés positivement dans les protéines du tissu bloque les charges positives du tissu, donc diminue le bruit de fond induit par l'attraction des charges négatives de la ribosonde aux charges positives du tissu. L'acétylation inactive aussi les RNases.			
	<i>Rinçages</i> (PBS 1X, DEPC 0,01%)	Le DEPC inactive les RNases.			
Hybridation		Le formamide déstabilise les liaisons hydrogènes entre les bases, permettant de diminuer la température d'hybridation des ribosondes aux ARNm cibles.			
	<i>Tampon d'hybridation</i> (formamide 50%, SSC 5X, denhardt 5X, ADN de	Le SSC concentre la solution en cations monovalents qui réduisent la répulsion négative des deux brins ARN- ARN à hybrider.			
	sperme de saumon 1mg/ml, tween 20 0,1%, DEPC 0,04%)	La solution de denhardt (contient des polymères à haut poids moléculaire) et l'ADN de sperme de saumon saturent les sites de liaison non spécifiques.			
		Le tween 20 est un détergent qui perméabilise les membranes des cellules donc favorise la pénétration des ribosondes dans les cellules.			
	Stringence	La diminution de concentration en SSC, donc en cations			
Post- hybridation	(SSC 0,1X, tween 20 0,05% à 72°C)	ARN et la haute température permettent de séparer les brins imparfaitement appariés donc non spécifiques.			
	<i>Révélation</i> (AP 1X, NBT, BCIP, pH 9,5)	La phosphatase alcaline (couplée à l'anticorps anti- digoxigénine) déphosphoryle le BCIP. Le « BCIP » déphosphorylé se dimérise, ce qui libère des ions hydrogènes qui réduisent le NBT en un précipité insoluble bleu/violet foncé (figure 34).			

Tableau 5 : Fonctions des solutions utilisées dans les étapes d'une hybridation in situ.

d. Double marquage par hybridation in situ

Afin d'économiser des coupes de cerveaux et d'optimiser le temps passé à réaliser les HIS, j'ai effectué des doubles marquages par HIS de certains ARNm (*somatostatine* et $TSH\beta$). En effet, dans ces cas, les deux ARNm analysés sont situés dans des cellules localisées dans des régions distinctes, et qui sont représentées sur les 16 coupes sélectionnées dans les séries de lame.

L'hybridation simultanée de deux riboprobes est possible si les deux ribosondes sont marquées par deux haptènes différents ($TSH\beta$ -DIG et *somatostatine*-FLUO) afin que l'anticorps anti-haptène ne reconnaisse qu'une ribosonde à la fois et que les deux riboprobes s'hybrident à la même température. La présence des hybrides $TSH\beta$ a été détectée par une révélation chromogénique au NBT/BCIP (bleu foncé), suivie d'une élution de l'anticorps de cette première immuno-détection puis le marquage des hybrides *somatostatine* a été révélée par une détection chromogénique au Fast Red (Sigma-Aldrich) (rose). L'élution dénature et détache les anticorps sans affecter le précipité coloré obtenu lors de la première immuno-détection de sorte que ces anticorps n'interfèrent pas avec le second immunomarquage.

J'ai effectué le protocole standard d'HIS préalablement décrit en hybridant simultanément les deux riboprobes diluées chacune à 1/100 dans le même tampon d'hybridation à 60°C puis réalisé les étapes de stringence du protocole standard d'HIS. J'ai d'abord détecté la riboprobe marquée à la digoxigénine en bloquant les sites non spécifiques puis en incubant l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline dont l'activité a été révélée en présence des substrats NBT/BCIP. J'ai arrêté la réaction en rinçant abondamment les lames à l'eau de ville. Ensuite, j'ai élué l'anticorps antidigoxigénine, en incubant les lames dans un tampon d'élution dénaturant (glycine 100 mM, triton X-100 à 0,3%, pH 2,2) (2x15 min), puis après rinçage au PBS 1X (2x5 min), j'ai réalisé une fixation pendant 5 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% et tampon phosphate. Les coupes ont été rincées au PBS 1X (4x5 min), placées dans une solution d'A-DIG 1X et tween 20 à 0,05% (2x5 min) et ensuite incubées pendant au moins 1 h dans une nouvelle solution de blocage en chambre humide (300 µl/lame), puis avec l'anticorps anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline dilué à 1/1000 dans la solution de blocage (350 µl/lame), toute une nuit en chambre humide. Enfin, les lames ont été rincées avec une solution d'A-DIG 1X et tween 20 à 0,05% (3x10 min) puis équilibrées dans du tampon Tris salin 1X à pH 8,4 (PA). La révélation de l'activité phosphatase alcaline a été effectuée en incubant les lames dans une solution de Fast Red et de NAMP (Naphtol AS-MX Phosphate, Sigma-Aldrich) pendant 24h. Pour cela, 50 mg/ml de NAMP ont été dilués à 1/250 dans un tampon PA avec de l'alcool polyvinylique (PVA) à 4%, puis 50 mg/ml de Fast Red ont été dilués à 1/100 dans la solution PA-PVA-NAMP. En étant déphosphorylé par la phosphatase alcaline, le NAMP se lie au Fast Red, le produit forme alors un précipité rose insoluble. La réaction a été arrêtée en rinçant abondamment les lames à l'eau de ville. Les lames ont été recouvertes de Crystal Mount, séchées, puis incubées dans les bains de toluène et les lamelles ont été scellées sur les lames à l'Eukitt®.



Figure 35 : Représentation schématique des détections immuno-enzymatiques des hybrides ARNm.

9. <u>Immunohistochimie</u>

a. Principe

Les expressions protéiques de la vimentine et de la kisspeptine ont été évaluées par analyse semi-quantitative de simples marquages immunohistochimiques colorimétriques. Les IHC ont permis de localiser la présence des protéines d'intérêt dans le tissu par détection enzymatique des liaisons antigène-anticorps primaire dont le signal a été amplifié par un système biotine/avidine de forte affinité. Les temps d'incubation des différentes solutions et la révélation enzymatique des immunomarquages étant rapides, les lames d'animaux issus du même groupe expérimental ont été traitées par IHC en deux séries pour minimiser la différence de temps d'incubation entre les premières et dernières lames incubées dans les solutions. J'ai veillé à inclure des lames de la moitié des animaux issus de chaque groupe expérimental dans chacune de ces deux séries d'IHC.

b. Réactivation antigénique et blocage des sites non spécifiques

La fixation, la déshydratation et l'enrobage en PEG du tissu peuvent modifier les structures des antigènes ciblés et par conséquent affecter l'immunoréactivité du tissu. Le démasquage antigénique par la chaleur, aussi appelé HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*), a été réalisé en incubant les lames, préalablement équilibrées dans de l'eau déminéralisée, dans une solution de récupération de tampon citrate à 40 mM, à pH 6, maintenue à 95°C pendant 1 h, avant d'être lentement refroidies à température ambiante pendant 1 h. La chaleur a dénaturé les protéines qui se renaturent progressivement dans une conformation correcte et stable à plus faibles température et force ionique. Les lames ont été rincées avec du TBS 1X (2x2 min) puis un contour hydrophobe a été dessiné autour des coupes avec un crayon PAP PEN. Chaque lame a été incubée avec 300 μ l d'une solution de blocage riche en protéines (Régilait 3% dans du TBS 1X, tween 20 à 0,05%, et NaN₃ à 0,02%) en chambre humide pendant au moins 1 h.

c. Incubation des anticorps et amplification du signal

Chaque lame a été incubée toute une nuit avec 350 μ l d'une solution d'incubation (TBS 1X avec tween 20 à 0,05%, NaN₃ à 0,02% et sérum d'âne à 1%) dans laquelle l'anticorps primaire a été dilué (tableau 6 pour le détail des anticorps et dilutions). Les coupes ont été rincées avec une solution de TBS 1X et tween 20 à 0,05% (3x10 min) puis incubées pendant 2 h avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué à 1/2000 dans la même solution d'incubation (tableau 6). Les coupes ont été rincées avec une solution de TBS 1X et tween 20 à 0,05% (3x10 min) puis incubées pendant 1 h avec une solution de neutravidine couplée à la peroxydase de Raifort (HRP) (ThermoScientific) diluée à 1/2000 dans une solution de TBS 1X, tween 20 à 0,05% et gélatine de peau de poisson d'eau froide à 0,1%.

Protéine d'intérêt	Anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Anticorps secondaire biotinylé	
Kisspeptine	Antisérum de lapin anti- kisspeptine 52 de rat (JLV-1, Mikkelsen et Simonneaux, 2009)	1/1500	Mûle anti-lapin biotinylé (Jackson)	
Vimentine	Souris anti-vimentine (V9 V6630, SigmaAldrich)	1/250 000	Mûle anti-souris biotinylé (Jackson)	

Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunohistochimies.

d. Révélation par détection de l'activité enzymatique

Les coupes ont été rincées avec une solution de TBS 1X et tween 20 à 0,05% (3x10 min), puis équilibrées avec un tampon tris-imidazole (TBI) 1X pendant 10 min. La révélation colorimétrique de l'activité peroxydase a été réalisée en incubant les coupes avec une solution de diaminobenzidine (DAB, Acros Organics) dont l'oxydation par la HRP produit un précipité brun au site de liaison. Pour cela, 50 mg/ml de DAB ont été dilués à 1/100 dans une solution de TBI 1X dans laquelle 1 μ l/ml d'H₂O₂ à 3% ont été ajoutés comme substrat oxydable. La révélation a été suivie à la loupe binoculaire et a été rapidement arrêtée au bout de 10 à 15 min en rinçant les coupes abondamment à l'eau de ville. Le précipité obtenu étant résistant aux solvants, les lames ont été déshydratées dans des bains d'alcool 70% (5 min) - 95% (5 min) - 100% (2x5 min) et de toluène (2x10 min), puis les lamelles ont été scellées sur les lames avec l'Eukitt®.

10. Acquisition et analyse des images

Pour chaque marquage, toutes les lames issues du même protocole expérimental ont été analysées ensemble.

Pour les marquages de somatostatine, POMC, vimentine, TSH β et Dio3 obtenues lors de l'expérience 1, des photographies ont été prises à l'objectif 10 X 0,63 par un appareil photo numérique Olympus DP 50 (Olympus) relié à un microscope DMRB (Leica). Lors de l'acquisition des images, j'ai pris soin de standardiser les réglages du microscope et de la caméra afin de garantir des conditions d'éclairage identiques. Une image sans tissu a été prise pour chaque lame et soustraite des images échantillonnées afin de s'affranchir des différences de bruit de fond entre lames. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, NIH).

Pour les marquages de la somatostatine et de la POMC, la valeur moyenne des niveaux de gris des pixels des marquages des neurones a été mesurée à l'aide d'un cercle de taille fixe superposé sur au moins 50 neurones par animal, comme décrit précédemment (Cazarez-Marquez *et al.*, 2019). L'expression de l'ARNm de la somatostatine ne présentant des variations photopériodiques que dans la partie caudale de l'ARC (Herwig *et al.*, 2012), l'intensité des neurones à somatostatine a été mesurée dans 3-4 coupes/animal de cette région (bregma -2,4 à -2,18). L'intensité des neurones à POMC a été mesurée de la même façon sur 6-7 images/animal couvrant toute l'étendue de l'ARC.

Pour le marquage de la TSH β , la densité intégrée (valeur moyenne des niveaux de gris divisée par l'aire) a été mesurée sur 3-4 coupes/animal à l'aide d'une ligne de 65 μ m de large couvrant l'étendue de la *pars tuberalis*, en ayant pris soin de sélectionner des sections aux mêmes plans anatomiques pour tous les animaux.

Pour le marquage de la Dio3, celui-ci étant diffus dans les corps cellulaires et les prolongements des tanycytes- α , un seuillage standardisé a permis de sélectionner et mesurer la densité intégrée du marquage Dio3 de 3 coupes/animal, en ayant pris soin de sélectionner des sections aux mêmes plans anatomiques pour tous les animaux.

Pour le marquage de la vimentine, les immunomarquages ont été analysés sur 2 coupes/animal contenant l'éminence médiane contactée par les prolongements des tanycytes. Les corps cellulaires des tanycytes qui tapissent le troisième ventricule ont été délimités par une ligne de 14 µm de large dans laquelle les niveaux de gris moyens des pixels ont été mesurés.

Pour le marquage du RFRP, les neurones ont été observés à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX41) équipé d'une caméra (Olympus EP50), comptés manuellement et ce comptage a été normalisé par le nombre de sections comptées. Lors du comptage, nous avons inclus des sections qui ne contenaient pas de marquage RFRP rostralement et caudalement à l'hypothalamus dorso-médial, afin d'obtenir un comptage complet du nombre de neurones marqués dans tous l'hypothalamus.

Pour les marquages de la kisspeptine des expériences 1 et 2, ainsi que tous les marquages de l'expérience 2, les lames ont été scannées au Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu) à l'aide du programme NDP.scan. Les mêmes analyses imageJ de celles décrites pour l'expérience 1 ont été réalisées pour les marquages Dio2 (comparativement à Dio3), TSHβ et somatostatine.

Afin d'améliorer la cohérence des comptages et de détecter toutes les cellules marquées lorsque le nombre de cellules est important, j'ai utilisé une méthode de détection automatique des cellules à l'aide du logiciel QuPath (v0.4.0, Bankhead *et al.*, 2017) pour les marquages du RFRP (expérience 2) et de la kisspeptine (expériences 1 et 2). Les cellules positives au RFRP ont été détectées sur la base de paramètres nucléaires morphologiques et d'intensité de marquage (dont les détails se trouvent en **annexe** 1). Une méthode de détection cellulaire par *deep learning* a permis le comptage de la totalité des cellules positives à la kisspeptine de l'ARC, en ajustant les paramètres de détection du modèle pré-entraîné *« dsb2018_heavy_augment.pb »* dont les détails du script sont en **annexe 2** (StarDist, Schmidt *et al.*, 2018). Suite à la détection automatique des cellules, j'ai vérifié pour chaque coupe que les objets détectés étaient bien des cellules d'intérêt marquées et les erreurs de détection du programme (petites poussières ou tâches) ont pu être corrigées en supprimant manuellement la sélection de l'objet.

11. **Dosages plasmatiques**

a. Dosages du BPA-glucuronide et de la testostérone par LC/MS-MS

Le dosage plasmatique du BPA-glucuronide, principal métabolite du BPA, a permis de vérifier que l'exposition au BPA a bien été assimilée dans l'organisme des animaux exposés, mais pas dans celui des animaux contrôles. En outre, le dosage de la concentration du métabolite chez les animaux contrôles a permis de vérifier l'absence de la libération potentielle de BPA par le matériel plastique de laboratoire (tubes, pointes à pipette, seringue, solvants, capillaires) utilisés lors du prélèvement sanguin et du dosage, au moins à un niveau détectable.

La testostérone et le BPA-glucuronide plasmatiques ont été analysés simultanément par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) au sein de la plateforme de spectrométrie de masse de l'INCI, avec Virginie Andry et Yannick Goumon. Brièvement, la LC-MS/MS combine la chromatographie liquide (LC) avec la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La LC permet de séparer l'échantillon en fonction de ses propriétés physico-chimiques avant d'être injecté dans la source de la MS/MS. La source ionise chaque composé de l'échantillon pour leur conférer une charge avant qu'il pénètre dans l'analyseur. Au sein de l'analyseur, les composés sont sélectionnés selon leur rapport masse sur charge puis fragmentés. Ces fragments sont détectés, et l'analyse de leur profil de fragmentation, temps de rétention, rapport masse sur charge permet d'identifier et de quantifier avec précision les molécules d'intérêt.

Dans un premier temps, 15 μ l d'étalons internes (3,3 μ M de testostérone-[2H4] + 13,3 μ M de BPA-glucuronide [13C12]) et 450 μ l d'acétonitrile ont été ajoutés à 150 μ l d'échantillon de plasma. Les échantillons ont été vortexés et centrifugés à 20 000xg pendant 30 min à 4°C pour une première purification. Les surnageants ont été recueillis, séchés sous vide, suspendus dans 30 μ l d'acétonitrile à 40 % + 0,1 % d'acide formique et centrifugés à 20 000xg pendant 20 min à 4°C. 15 μ l du surnageant ont été utilisés pour l'analyse de la testostérone tandis que les 15 μ l restants ont été traités pour l'analyse du BPA-glucuronide. Pour le dosage de la testostérone, 15 μ l du surnageant ont été séchés sous vide, remis en suspension dans 15 μ l de la solution Amplifex Keto Reagent Kit pendant 1 h à température ambiante pour augmenter le signal de la testostérone avec la LC-MS/MS. Les échantillons contenant la testostérone ont ensuite été centrifugés à 20 000xg pendant 10 min à 4°C. Les analyses ont été réalisées sur 4 μ l d'échantillons avec un système HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Electron) couplé à un spectromètre de masse Endura triple quadripôle (Thermo Electron) en mode positif (testostérone) ou négatif (BPA-glucuronide). La séparation chromatographique de la testostérone ou du BPA-glucuronide a été réalisée à l'aide d'une colonne Zorbax SB-C18 (150 x 1 mm, 3,5 μ m) cahuffée à 40°C et d'un gradient d'acétonitrile dont les détails sont indiqués en **annexe 3**.

L'identification des composés a été basée sur les ions précurseurs, les ions fragments sélectifs (les ions fils) et les temps de rétention obtenus pour la testostérone, le BPA-glucuronide et leurs étalons

internes. La quantification a été effectuée en calculant le rapport de la surface du pic entre l'ion fils de la testostérone ou du BPA-glucuronide et leurs étalons internes.

b. Dosages de l'insuline et de l'œstradiol par ELISA

i. Insuline

L'insuline a été mesurée dans des échantillons de plasma dilués 20 fois à l'aide du kit ELISA pour insuline de hamster (#90336, CrystalChem, Cazarez-Marquez *et al.*, 2019). Ce test a une limite de sensibilité de 0,05 ng/ml. Les variations intra-dosages étaient de 8%, et ont été calculées selon la formule suivante :

Variation intra-dosage (%) = $\frac{déviation standard}{moyenne des densités optiques entre duplicats} \times 100$

Les variations inter-dosages étaient de 13,9% et ont été calculées selon la formule suivante :

Variation inter-essai (%) = $\frac{déviation standard des moyennes entre plaques}{moyenne des densités optiques entre plaques} \times 100$

ii. <u>Estradiol</u>

Le dosage de l'œstradiol plasmatique des hamsters femelles a été réalisé à l'aide d'un kit ELISA compétitif (#501890, Cayman Chemical) que j'ai optimisé sur des échantillons de hamsters afin de minimiser les volumes de plasma requis. Pour ce dosage, 240 μ l de méthanol ont été ajoutés à 60 μ l de plasma et le tout a été centrifugé à 2000xg pendant 10 min pour précipiter les protéines. Le surnageant a été séché et repris dans 120 μ l du tampon ELISA sur lesquels j'ai réalisé le dosage de l'œstradiol par ELISA en duplicat. Le protocole du kit a ensuite été suivi pour le dosage de l'œstradiol. Les variations intra- et inter-dosages étaient < 5%, et le test présentait une sensibilité de 20 pg/mL.

12. <u>Analyses statistiques</u>

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM) et ont été analysées à l'aide de GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). La normalité des données a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk avant chaque analyse, avant de décider de l'utilisation d'un test statistique paramétrique ou non.

Les valeurs répétées ont été analysées par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) suivie de tests *post hoc* de Dunnett. Des modèles mixtes ont été utilisés à la place de l'ANOVA à deux facteurs lorsque des valeurs étaient manquantes. Les comparaisons entre groupes multiples ont été réalisées par ANOVA à un facteur ou des tests de Kruskal-Wallis, suivis de tests *post hoc* de Dunnett. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées à l'aide de tests de Student ou Wilcoxon-Mann-Whitney. Le seuil de signification a été fixé à une valeur-p< 0,05.

Résultats

1. Le BPA-glucuronide est détecté dans le plasma des hamsters exposés au BPA

Afin de vérifier l'efficacité de l'exposition alimentaire au BPA et de s'assurer que les animaux contrôles ont été exposés à une contamination minimale de BPA, la concentration du principal métabolite du BPA, le BPA-glucuronide, a été mesurée dans le plasma des hamsters des différents groupes. Des concentrations plasmatiques notables de BPA-glucuronide ont été trouvées chez les hamsters mâles et femelles exposés à 50 et 500 μ g de BPA/kg/jour en PC (expérience 1) et PL (expérience 2), mais aucune trace de BPA-glucuronide n'a été détectée dans le plasma des animaux exposés au véhicule (éthanol 0,02%) et à 5 μ g de BPA/kg/jour (figures 35A, 37A, 39A, 41A).

2. <u>Évaluation de l'intégration de la photopériode courte sur divers paramètres</u> physiologiques et neuroendocrinologiques de hamsters femelles et mâles exposés oralement au BPA

Les hamsters mâles et femelles contrôles (exposés au solvant) transférés en PC ont en très grande majorité présentés un phénotype métabolique et reproducteur de type PC, comparativement aux animaux maintenus en PL (figures 35B, 37B ; tableaux 7 et 8), sauf les 5 individus exclus selon les critères indiqués dans le matériel et méthodes. De même les niveaux d'expression des facteurs clés intégrant le message photopériodique ou régulant l'activité reproductive ou métabolique chez les hamsters contrôles après un transfert de 10 semaines en PC ont montré les variations attendues (figures 36 et 38), soit une diminution pour $TSH\beta$ et Rfrp et une augmentation pour Dio3, Kisspeptine, Somatostatine, à l'exception de Pomc qui n'était pas significativement augmenté chez les mâles maintenus en PL (figure 38).

Les hamsters femelles transférées en PC ont maigri, perdant 24,6 % (\pm 1,10) de leur masse corporelle en moyenne pour tous les groupes à l'issue des 10 semaines de PC (figure 35B). Cependant, j'ai observé différents profils de cinétique de perte de poids corporel entre les groupes. Afin d'analyser ces cinétiques, un modèle de régression non linéaire a été ajusté aux données brutes individuelles de poids corporel afin d'extraire le point d'inflexion qui définit le moment d'apparition du phénotype PC du poids corporel, et la pente de la courbe qui définit la vitesse de la perte de poids corporel. La transition vers le phénotype PC du poids corporel a été amorcée entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine de PC pour les femelles exposées au véhicule, à 5 et 50 µg de BPA/kg/jour, et significativement plus d'une semaine après pour les femelles exposées à 500 µg de BPA/kg/jour (figure 35B). Le ratio d'efficacité alimentaire (REA) qui calcule le gain de poids corporel par unité d'aliments consommés, indique l'efficacité de conversion les aliments en masse corporelle. Le groupe de femelles exposées à 500 µg de BPA/kg/jour a aussi présenté des REA plus élevés pendant les deux premières semaines de PC (figure 35C), malgré des REA de base similaires au REA observés pour les autres groupes.

Cependant, les rapports glucose/insuline (G/I), qui indiquent la sensibilité à l'insuline, étaient comparables entre les différents groupes indépendamment de l'exposition aux différentes doses de BPA (tableau 7).

Le suivi des changements photopériodiques de la qualité et de la couleur du pelage (index défini par Figala *et al.*, 1973), toutes les deux à trois semaines à partir du début du transfert en PC, a montré que les femelles exposées à 500 μ g de BPA/kg/jour présentaient également un retard transitoire significatif du blanchiment du pelage au cours de la deuxième semaine de PC par rapport au groupe exposé au véhicule (figure 35D).

La PC a induit une forte diminution du poids relatif de l'utérus et des ovaires mais n'a pas été associée à des concentrations circulantes plus faibles d'œstradiol par rapport aux femelles maintenues en PL. L'exposition aux différentes doses de BPA n'a pas affecté la régression des organes reproducteurs induite par la PC (tableau 7).

L'exposition à 500 µg de BPA/kg/jour a induit une forte diminution de l'expression de la *Somatostatine* dans le noyau arqué alors qu'aucun des autres gènes étudiés n'ont montré de différences d'expression suite à l'exposition aux différentes doses de BPA pendant les 10 semaines de PC (figure 36).

Les hamsters mâles transférés en PC ont progressivement maigri, perdant en moyenne 23,9% (\pm 1,4) de leur poids corporel après 10 semaines de PC, sans différence significative entre les groupes (figure 37B). Cependant, le phénotype PC du poids corporel est apparu significativement une semaine plus tôt (4 semaines) chez les mâles exposés à 5 µg de BPA/kg/jour par rapport aux animaux du groupe contrôle (figure 37B). La vitesse de perte de poids corporel induite par la PC était similaire entre tous les groupes de mâles (figure 37B). Les mâles exposés à 5 µg de BPA/kg/jour ont également montré des REA plus faibles que ceux des animaux du groupe contrôle au cours de la 5^{ème} semaine du transfert en PC (figure 37C). Les rapports G/I étaient comparables entre les différentes conditions photopériodiques, mais l'exposition à 5 µg de BPA/kg/jour a induit un rapport G/I plus élevé chez les mâles (tableau 8).

Après 10 semaines de PC, les mâles arboraient tous un pelage plus blanc et duveteux (stade 3). Cependant, le blanchiment du pelage a été transitoirement plus avancé pour les mâles exposés à 5 et 50 µg de BPA/kg/jour à la 8^{ème} semaine de PC (figure 37D).

Après 10 semaines de PC, les hamsters ont tous présenté une diminution drastique du poids des testicules et des vésicules séminales et des concentrations circulantes de testostérone indétectables, par rapport aux hamsters maintenus en PL (tableau 8).

Chez ces hamsters mâles, l'exposition à diverses doses de BPA n'a induit aucun changement d'expression des gènes et des protéines analysés après les 10 semaines de PC (figure 38).

Ainsi, lors du transfert d'une PL à une PC inhibitrice, les femelles exposées à la plus forte dose testée de BPA (500 μ g de BPA/kg/jour) ont acquis le phénotype métabolique de la PC plus tardivement à l'issue des 10 semaines de PC : retard d'une semaine de l'acquisition du poids corporel de type PC, REA plus élevés au cours des deux premières semaines de PC, expression plus faible de la *Somatostatine* hypothalamique et retard transitoire du blanchiment de pelage en début de PC. À l'inverse, les mâles exposés à la plus faible dose testée de BPA (5 μ g de BPA/kg/jour) ont acquis le phénotype métabolique de la PC plus rapidement : avance d'une semaine de l'acquisition du poids corporel de type PC, REA diminué à la 5^{ème} semaine de PC et avance transitoire du blanchiment du pelage en fin de PC, cependant sans modification significative de l'expression des gènes du métabolisme testés. Ces résultats suggèrent que l'exposition au BPA chez des hamsters djungariens adultes transférés en PC n'altère pas l'intégrité de l'adaptation physiologique à la PC mais modifie plutôt sa cinétique d'intégration d'une façon sexeet dose-dépendante.



Figure 36 : Concentration plasmatique en BPA-glucuronide, et effet de l'exposition au BPA sur la cinétique de perte de poids corporel, le ratio d'efficacité alimentaire et les variations du pelage de hamsters djungariens femelles transférées pendant 10 semaines en PC.

(A) Concentrations de BPA-glucuronide mesurées par LC-MS/MS dans le plasma de hamsters djungariens femelles maintenues en PL et nourries avec un régime contrôle (PL + veh) ou transférées en PC et nourries avec un régime contrôle (PC + veh) ou exposées à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 µg/kg/jour de BPA (PC + BPA 500) via l'alimentation. (B) Pourcentage du poids corporel des femelles exposées au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC, début du phénotype de poids corporel de la PC et vitesse de la perte de poids corporel. (C) Ratio d'efficacité alimentaire cumulé des femelles exposées au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC. Pour chaque groupe, le ratio d'efficacité alimentaire de base a été calculé avant le transfert en PC. (D) Score du pelage des femelles exposées au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC. Les valeurs individuelles sont présentées comme des moyennes \pm SEM de 6 à 8 hamsters par groupe. Les valeurs dont les mesures ont été répétées dans le temps ont été analysées par ANOVA à deux facteurs ou modèles mixtes avec test post hoc de Dunnett pour les comparaisons multiples (b, p<0.05 entre le groupe PC + BPA 5 vs le groupe PC + veh ; c, p<0.05 entre le groupe PC + BPA 50 vs le groupe PC + veh ; d, p<0.05 entre le groupe PC + BPA 500 vs le groupe PC + veh). Pour les autres comparaisons entre les groupes, l'ANOVA à un facteur avec le test *post hoc* de Dunn pour les comparaisons multiples ou le test-t ont été utilisés (*, p<0.05 par rapport au groupe PC + veh). PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

	PL + veh (n=8)	PC + veh (n=8)	PC + BPA 5 (n=8)	PC + BPA 50 (n=7)	PC + BPA 500 (n=5)
Poids relatif de l'utérus et des ovaires (mg/g de poids corporel)	2,51 ± 0,21 ^a	1,74 ± 0,06	1,96 ± 0,15	1,78 ± 0,15	1,93 ± 0,22
Œstradiol (pg/mL de plasma)	283,4 ± 63,2	232 ± 114,7	337,1 ± 125,1	162,4 ± 45,7	146,8 ± 44,5
Ratio glucose/insuline	19,4 ± 4,13	24,43 ± 2,88	27,17 ± 4,19	25,69 ± 5,27	24,8 ± 3,44

Tableau 7 : Poids relatif de l'utérus et des ovaires, concentrations plasmatiques d'œstradiol et rapport glucose/insuline de hamsters djungariens femelles exposées oralement au véhicule (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) μ g de BPA/kg/jour pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou maintenues en photopériode longue (PL + veh).

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne \pm SEM. Pour vérifier l'effet photopériodique, les comparaisons entre les groupes témoins PL et PC ont été analysées à l'aide de tests t (*a*, p<0,05 entre PL + veh et PC + veh). Les comparaisons entre les femelles exposées au BPA et au véhicule dans le groupe PC ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité), PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 37 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la *pars tuberalis*, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens femelles après 10 semaines en photopériode courte pendant lesquelles elles ont été exposées oralement à différentes doses de BPA.

L'expression de *TSH* β , *Dio3*, *Rfrp*, *Pomc* et *Somatostatine* a été évaluée par hybridation *in situ* non radioactive et celle de Kisspeptine et Vimentine par immunohistochimie (IHC). Les hamsters femelles ont été exposées par l'alimentation au véhicule (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) µg/kg/jour de BPA pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou ont été maintenues en photopériode longue avec de la nourriture véhicule (PC + véhicule). Les données sont indiquées en valeurs individuelles et en moyenne ± SEM de n = 5-9 hamsters/groupe. Lorsque cela était possible, l'effet photopériodique a été vérifié en comparant les groupes véhicules PL et PC par des tests-t (*a*, p<0,05 entre PL + veh et PC + veh). Les comparaisons entre les femelles exposées au BPA et au véhicule en PC ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur et le test *post hoc* de Dunn (**, p<0.01).

PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité), PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 38 : Concentrations plasmatiques en BPA-glucuronide et effet de l'exposition au BPA sur la cinétique de perte de poids corporel, le ratio d'efficacité alimentaire et les variations du pelage de hamsters djungariens mâles transférés pendant 10 semaines en PC.

(A) Concentrations de BPA-glucuronide mesurées par LC-MS/MS dans le plasma de hamsters djungariens mâles maintenus en PL et nourris avec un régime contrôle (PL + veh), transférés en PC et nourris avec un régime contrôle (PC + veh), ou exposés à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50), ou 500 µg/kg/jour de BPA (PC + BPA 500) via l'alimentation. (B) Pourcentage du poids corporel des mâles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC. Un modèle de régression non linéaire a été ajusté aux données brutes de poids corporel individuel sur les 10 semaines de PC afin d'extraire le point d'inflexion et la pente de chaque courbe de poids corporel individuel, définis respectivement comme le moment du début du phénotype de poids corporel de la PC et la vitesse de la perte de poids corporel. (C) Ratio d'efficacité alimentaire cumulé des mâles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC. Pour chaque groupe, le ratio d'efficacité alimentaire de base a aussi été calculé avant le transfert en PC. (D) Score du pelage des mâles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PC. Les valeurs individuelles sont représentées comme des moyennes \pm SEM de 6 à 10 hamsters par groupe. Les valeurs dont les mesures ont été répétées dans le temps ont été analysées par ANOVA à deux facteurs ou modèles mixtes suivis de test *post hoc* de Dunnett pour les comparaisons multiples (b, p<0,05 entre le groupe PC + BPA 5 et PC + veh ; c, p<0,05 entre le groupe PC + BPA 50 et PC + veh). Pour les autres comparaisons entre groupes, l'ANOVA à un facteur avec le test post hoc de Dunn pour les comparaisons multiples ou le test-t ont été utilisés (*, p<0.05 par rapport au groupe PC + veh). PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8)heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

	PL + veh (n=10)	PC + veh (n=8)	PC + BPA 5 (n=7)	PC + BPA 50 (n=6)	PC + BPA 500 (n=6)
Poids relatif des testicules (mg/g de poids corporel)	20,3 ± 1,76 ^a	1,77 ± 0,25	1,60 ± 0,14	1,56 ± 0,18	1,50 ± 0,14
Poids relatif des vésicules séminales (mg/g de poids corporel)	7,35 ± 0,96 ^a	2,07 ± 0,54	0,91 ± 0,23	1,78 ± 0,80	1,54 ± 0,48
Testostérone (pg/mL de plasma)	35,81 ± 15,70	ND	ND	ND	ND
Ratio glucose/insuline	14,42 ± 3,78	23,54 ± 5,45	49,15 ± 10,16 ^b	40,12 ± 11,34	34,36 ± 5,15

Tableau 8 : Poids relatif des testicules et des vésicules séminales, concentrations plasmatiques de testostérone et rapport glucose/insuline de hamsters djungariens mâles exposés oralement au contrôle (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) μ g de BPA/kg/jour pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou maintenus en photopériode longue (PL + veh).

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne \pm SEM. Pour vérifier l'effet photopériodique, les comparaisons entre les groupes témoins PL et PC ont été analysées à l'aide de tests-t (*a*, p<0,05 entre les groupes PL + veh et PC + veh). Les comparaisons entre les mâles exposés au BPA et au véhicule en PC ont été analysées à l'aide de l'ANOVA à un facteur avec le test *post hoc* de Dunn pour les comparaisons multiples (*b*, p<0,05 entre le groupe PC + BPA 5 et le groupe PC + veh). PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité), PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, ND = non détectable, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 39 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la *pars tuberalis*, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens mâles après 10 semaines en photopériode courte pendant lesquelles ils ont été exposés oralement à différentes doses de BPA. L'expression de *TSHβ*, *Dio3*, *Rfrp*, *Pomc* et *Somatostatine* a été évaluée par hybridation *in situ* non radioactive et celle de Kisspeptine et Vimentine par immunohistochimie (IHC). Les hamsters mâles ont été exposés par l'alimentation au véhicule (PC + veh) ou à 5 (PC + BPA 5), 50 (PC + BPA 50) ou 500 (PC + BPA 500) µg/kg/jour de BPA pendant 10 semaines de transfert en photopériode courte, ou ont été maintenus en photopériode longue avec de la nourriture véhicule (PC + véh). Les données sont indiquées en valeurs individuelles et en moyenne ± SEM de n = 5-10 hamsters/groupe. Lorsque cela était possible, l'effet photopériodique a été vérifié en comparant les groupes véhicules PL et PC par des tests t (*a*, p<0,05 entre PL + véh et PC + véh). Les comparaisons entre les mâles exposés au BPA et au véhicule en PC ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. PL = photopériode longue (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité), PC = photopériode courte (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

3. <u>Évaluation de l'intégration de la photopériode longue sur divers paramètres</u> physiologiques et neuroendocriniens d'hamsters femelles et mâles exposés oralement <u>au BPA</u>

Dans un deuxième temps, nous avons évalué les impacts physiologiques et neuroendocriniens de l'exposition au BPA lors d'un paradigme photopériodique inverse. Ici, des hamsters maintenus en PL ont d'abord été adaptés à une PC pendant 11 semaines puis ont été exposés au BPA dès et durant le retour en PL (swPL, *switchback PL*) pendant 10 semaines. Lors de l'expérience précédente (transfert PL vers PC), j'ai observé que les hamsters exposés aux doses de 5 ou 500 μ g/kg/jour présentaient des changements physiologiques et neuroendocriniens plus altérés que ceux exposés à la dose intermédiaire de 50 μ g/kg/jour. Aussi j'ai fait le choix de ne pas évaluer la dose de 50 μ g/kg/jour pour cette deuxième étude, et d'étudier plutôt les impacts de l'exposition au BPA sur la cinétique d'intégration du message photopériodique en prélevant les animaux au cours (5 semaines) et à la fin (10 semaines) du swPL. Cependant, un nombre insuffisant de mâles, dû à une sur-mortalité, ne m'a pas permis de réaliser de prélèvements intermédiaires à 5 semaines de swPL pour ce sexe.

De façon générale les hamsters mâles et femelles contrôles (exposés au solvant) transférés en PL ont tous présentés un regain de poids corporel et un phénotype reproducteur de type PL (figure 39 et 41, tableaux 9 et 10). De même, chez les femelles, la majorité des gènes photopériodiques étudiés (*TSH* β , Kisspeptine, *Rfrp, Pomc, Somatostatine*) ont atteint des niveaux d'expression d'ARNm/protéines similaires à ceux de celles maintenues constamment en PL (figure 40). Chez les mâles, j'ai observé une forte réactivation du système thyroïdien hypothalamique (*TSH* β , *Dio2*) et des régulateurs centraux de l'axe métabolique (*Pomc, Somatostatine*) et l'expression de *Rfrp* dans l'hypothalamus dorsomédial n'avait pas encore atteint les niveaux des hamsters maintenus en PL après 10 semaines de swPL (figure 42).

Les hamsters femelles transférées en PL ont augmenté progressivement leur poids corporel pour atteindre en moyenne 23,1% (\pm 4,7) de gain de poids corporel à l'issue des 10 semaines de swPL, indépendamment de l'exposition au BPA. La transition vers le phénotype PL du poids corporel a eu lieu à la 6^{ème} semaine pour toutes les femelles. Néanmoins, celles exposées à 5 et 500 µg de BPA/kg/jour ont augmenté plus rapidement leur poids corporel que le groupe véhicule (figure 39B) et au cours des deux premières semaines de swPL, elles ont également présenté des REA plus importants par rapport aux femelles exposées au véhicule (figure 39C). Les concentrations de glucose dans le sang étaient comparables à celles des femelles maintenues en PL et n'ont pas été affectées par l'exposition au BPA (tableau 9).

Après 10 semaines de swPL, le pelage des femelles hamster était encore blanchâtre et ne s'assombrissait pas de manière significative pour aucun des groupes (figure 39D).
L'échantillonnage des tissus d'une partie des femelles à 5 semaines de swPL m'a permis d'observer que les femelles exposées au BPA présentaient des poids relatifs des utérus et des ovaires significativement différents des femelles exposées au véhicule. Les femelles exposées à 5 μ g de BPA/kg/jour tendaient à avoir des poids plus élevés tandis que celles exposées à 500 μ g de BPA/kg/jour tendaient à avoir des poids plus faibles (p<0,05 ; ANOVA à 1 facteur sans tests *post hoc* significatifs). Ces différences entre groupes se sont résorbées au bout de 10 semaines et les femelles ont finalement toutes montré une activité de l'axe reproducteur (poids des organes reproducteurs, œstradiol plasmatique) comparable voir même supérieure à celle des femelles maintenues constamment en PL (tableau 9).

Les hamsters femelles exposées à 5 μ g de BPA/kg/jour durant 10 semaines de swPL ont montré une expression de l'ARNm *Pomc* significativement plus faible que celle observée chez les femelles exposées au véhicule. Les autres changements photopériodiques d'expression génique n'étaient pas affectés par les l'exposition aux différentes doses de BPA. L'analyse de la dynamique des changements d'expression des gènes photopériodiques a pu être étudiée en comparant les expressions des ARNm/protéines entre le milieu (5 semaines) et la fin (10 semaines) du swPL pour chaque dose d'exposition. J'ai observé que les niveaux de Kisspeptine étaient significativement diminués entre le milieu et la fin de la swPL uniquement chez les femelles exposées à 5 μ g de BPA/kg/jour, suggérant une diminution plus rapide de la Kisspeptine à cette dose par rapport au groupe véhicule. J'ai également observé que l'exposition à 5 ou 500 μ g/kg/jour de BPA a ralenti l'augmentation de l'expression de *Pomc*, car seul le groupe exposé au véhicule présentait une augmentation significative du nombre de cellules positives à la *Pomc* entre la 5^{ème} et la 10^{ème} semaine (figure 40).

Les hamsters mâles transférés en PL, ont augmenté progressivement leur poids corporel, atteignant en moyenne 18,1% (\pm 3,4) de gain de poids corporel après 10 semaines de swPL, comparativement au poids de la dernière semaine de PC pour tous les groupes. D'après l'analyse de la cinétique de reprise de poids par régression non linéaire, tous les groupes de mâles, indépendamment de l'exposition au BPA, ont commencé la transition vers le phénotype PL entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine de swPL et la prise de poids corporel s'est faite à des vitesses équivalentes (figure 41B). L'adaptation à la PC a induit de faibles REA pour tous les groupes de mâles qui ont augmenté lorsque les mâles ont été transférés en PL, sans impact significatif de l'exposition au BPA (figure 41C). Les mâles présentaient des concentrations de glucose sanguin comparables à celles des animaux maintenus en PL (tableau 10). Après 10 semaines de swPL, le pelage des hamsters mâles était encore blanchâtre pour tous. Cependant, les mâles exposés à 5 µg/kg/jour ne montraient toujours pas de brunissement significatif de leur pelage en fin de protocole alors que ceux exposés au véhicule et à 500 µg de BPA/kg/jour présentaient un pelage significativement plus foncé à la fin du swPL par rapport à la fin de la PC (figure 41D).

Après 10 semaines de swPL, les mâles présentaient des poids relatifs des testicules et des vésicules séminales ainsi que des concentrations circulantes de testostérone comparables voir supérieurs à ceux des mâles maintenus constamment en PL, sans effet significatif de l'exposition aux différentes doses de BPA (tableau 10).

Les mâles exposés à 5 μ g de BPA/kg/jour au cours de la PL présentaient des niveaux d'expression de *TSH* β et de *Rfrp* inférieurs à ceux des mâles exposés au véhicule et l'exposition à la plus forte dose de BPA a diminué l'expression de *Dio2* dans les tanycytes (figure 42).

Ainsi, avec cette seconde expérience, j'ai à nouveau observé que les hamsters exposés au BPA étaient capables d'adapter leur phénotype métabolique et reproducteur au changement de photopériode, mais que la cinétique d'intégration du message photopériodique long était altérée. En effet, les femelles exposées aux deux doses testées de BPA ont acquis le phénotype métabolique de la PL plus rapidement (regain de poids corporel plus rapide, REA plus élevés au cours des deux premières semaines de PC). Cela a été associé, pour celles exposées à la plus faible dose de BPA, à des niveaux d'expression hypothalamique en *Pomc* plus faibles que les contrôles à l'issue des 10 semaines de PL. L'exposition au BPA a aussi accéléré l'induction de l'activité de l'axe reproducteur par la PL, puisque les femelles exposées à 5 μ g de BPA/kg/jour présentaient des organes sexuels plus gros que les contrôles après 5 semaines de PL et avaient déjà amorcé la diminution d'expression de la kisspeptine dans les neurones du noyau arqué, induite par le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels. D'autre part, les mâles exposés au BPA ont présenté des niveaux d'expression plus faibles de *TSH* β hypophysaire, de *Dio2* et de *Rfrp* hypothalamiques, mais n'ont pas montré de différence de dynamique dans l'acquisition du phénotype métabolique et reproducteur de la PL, sur les paramètres évalués.



Figure 40 : Concentration plasmatique de BPA-glucuronide, poids corporel, ratio d'efficacité alimentaire et variation du pelage des hamsters djungariens femelles exposées au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue.

(A) Concentrations de BPA-glucuronide mesurées par LC-MS/MS dans le plasma de hamsters djungariens femelles retransférées en PL (swPL) pendant 10 semaines et nourries avec un régime véhicule (swPL + veh), ou exposés à 5 (swPL + BPA 5) ou 500 µg de BPA/kg/jour (swPL + BPA 500) via la nourriture. (B) Pourcentage du poids corporel des femelles exposées au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PL. La valeur de base de 100 % a été mesurée le jour précédant le changement de l'éclairage en PL et le début de l'exposition au BPA. Un modèle de régression non linéaire a été ajusté aux données brutes de poids corporel individuel sur les 10 semaines de swPL afin d'extraire le moment du début du phénotype de poids corporel de la PL et la vitesse de la reprise de poids corporel. (C) Ratio d'efficacité alimentaire cumulé des femelles exposées au véhicule ou au BPA sur 10 semaines de swPL. Pour chaque groupe, le ratio d'efficacité alimentaire de base a été calculé avant le retour en PL (référence PC/pré-PL). (**D**) Score du pelage des femelles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de swPL. Les valeurs sont données en tant que données individuelles et/ou moyenne \pm SEM de n = 7-18 hamsters/groupe. Les valeurs répétées dans le temps ont été analysées par ANOVA à deux facteurs ou par des modèles mixtes et ont été comparées entre groupes par le test *post hoc* de Dunnett (b, p<0.05entre le groupe swPL + BPA 5 et le groupe swPL + veh, c, p<0,05 entre le groupe swPL + BPA 500 et le groupe swPL + veh). Pour les autres comparaisons entre les groupes, l'ANOVA à un facteur ou des ttests ont été utilisés (*, p<0.05 vs swPL + veh).

swPL = retour en photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) pendant 10 semaines après une adaptation de 11 semaines en photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = Bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

	PL + veh	swPL + veh		swPL + BPA 5		swPL + BPA 500	
		5 ^{ème}	10 ^{ème}	5 ^{ème}	10 ^{ème}	5 ^{ème}	10 ^{ème}
	-	semaine	semaine	semaine	semaine	semaine	semaine
Poids relatif de							
l'utérus et des	2,51 ± 0,21 ^{<i>a</i>}	1 62 +	4 55 +	2.10 +	363+	1 34 +	3 71 +
ovaires		0.10	0.52	_,	0.52	0.12	0.67
(mg/g de poids		0,10	0,52	0,22	0,52	0,12	0,07
corporel)							
Œstradiol	283,4 ± 63,2	240,2 ±	367 ±	171,4 ±	388,3 ±	159,3 ±	374,9 ±
(pg/mL de plasma)		42,4	105,5	42,4	89,8	35,1	59,8
Glucose	192,5 ± 11,9	174,2 ±	178 ±	178,9 ±	186,2 ±	165,9 ±	186 ±
(mg/dL de sang)		48,4	13,1	15	20,2	13,2	20,1

Tableau 9 : Poids relatif de l'utérus et des ovaires, concentrations plasmatiques d'æstradiol et glycémie de hamsters djungariens femelles exposées au véhicule (swPL + véhicule), 5 (swPL + BPA 5) ou 500 μ g/kg/jour de BPA (swPL + BPA 500) pendant 10 semaines de transfert en photopériode longue, ou maintenues constamment en photopériode longue (PL + véhicule).

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne \pm SEM de n = 7-9 hamsters/groupe. Pour vérifier l'effet photopériodique, les comparaisons entre les groupes exposés au véhicule en PL et swPL prélevés à la $10^{\text{ème}}$ semaine ont été analysées à l'aide de tests t (*a*, p<0,05). À la 5^{ème} et $10^{\text{ème}}$ semaine de transfert en PL, nous avons comparé les femelles exposées au BPA et au véhicule par une ANOVA à un facteur (*b*, p<0,05, test *post hoc* de Dunnett non significatif). swPL = retour en photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) pendant 10 semaines après une adaptation de 11 semaines en photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = Bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 41 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la *pars tuberalis*, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens femelles exposées au BPA pendant 10 semaines de transfert en photopériode longue (swPL) ou maintenues constamment en photopériode longue (PL).

L'expression de *TSH* β , *Dio2*, *Rfrp*, *Pomc* et *Somatostatine* a été évaluée par hybridation *in situ* non radioactive et celle de Kisspeptine et Vimentine par immunohistochimie (IHC). Les hamsters femelles ont été exposées par l'alimentation au véhicule (veh), 5 (BPA 5) ou 500 µg/kg/jour de BPA (BPA 500) lors du retour en photopériode longue (swPL) et ont été sacrifiées à la 5^{ème} ou à la 10^{ème} semaine de swPL. Un groupe de femelles a été maintenu en photopériode longue avec de la nourriture véhicule (PL + veh, barre grise, triangle noir). Les données sont indiquées en valeurs individuelles et en moyenne ± SEM de n = 7-12 hamsters/groupe. Lorsque cela était possible, l'effet photopériodique a été vérifié en comparant les groupes véhicules PL et swPL par des tests-t (a, p<0,05). Les comparaisons entre les femelles exposées au BPA et au véhicule à la 10^{ème} semaine de swPL ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur et un test *post hoc* de Dunn pour les comparaisons multiples (*, p<0,05 par rapport au groupe swPL + veh). Pour chaque dose, les changements dynamiques de l'expression des ARNm/protéines entre la 5^{ème} et la 10^{ème} semaine de swPL ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs et des tests *post hoc* de Sidak pour les comparaisons multiples (*, p<0,05, **, p<0,01, ****, p<0,001).

swPL = retour à une photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) après une adaptation de 11 semaines à une photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 42 : Concentration plasmatique de BPA-glucuronide, poids corporel, ratio d'efficacité alimentaire et variation du pelage des hamsters djungariens mâles exposés au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue.

(A) Concentrations de BPA-glucuronide mesurées par LC-MS/MS dans le plasma de hamsters djungariens mâles retransférés en PL (swPL) pendant 10 semaines et nourris avec un régime véhicule (swPL + veh) ou exposés à 5 (swPL + BPA 5) ou 500 μ g/kg/jour de BPA (swPL + BPA 500) *via* la nourriture. (B) Pourcentage du poids corporel des mâles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de PL. La valeur de base de 100 % a été mesurée le jour précédant le changement de l'éclairage en PL et le début de l'exposition au BPA. Un modèle de régression non linéaire a été ajusté aux données brutes de poids corporel de la PL et la vitesse de la reprise de poids corporel. (C) Ratio d'efficacité alimentaire cumulé des mâles exposés au véhicule ou au BPA sur 10 semaines de swPL. Pour chaque groupe, le ratio d'efficacité alimentaire de base a été calculé avant le retour en PL (référence PC/pré-PL). (D) Score du pelage des mâles exposés au véhicule ou au BPA pendant 10 semaines de swPL. Les valeurs sont données en tant que données individuelles et/ou moyenne ± SEM de n = 11-12 hamsters/groupe. Les valeurs répétées dans le temps ont été analysées par ANOVA à un facteur a été utilisée.

swPL = retour en photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) après une adaptation de 11 semaines en photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = Bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

		swPL	swPL	swPL
	PL + veh	+ veh	+ BPA 5	+ BPA 500
Poids relatif des				
testicules	20.2 ± 1.9	190 ± 1 1	20.0 ± 1.8	10.4 ± 1.2
(mg/g de poids	20,3 ± 1,0	10,9 ± 1,1	20,9 ± 1,0	19,4 ± 1,2
corporel)				
Poids relatif des				
vésicules	7 2 ± 0 07 8	12 + 1 1	12 + 1 /	12 + 1 1
séminales	7.3±0.97	13 ± 1,1	12 ± 1,4	13 ± 1,1
(mg)				
Testostérone				
(pg/mL de	35,9 ± 15,7	11,8 ± 3,5	33,4 ± 13,9	13,8 ± 6,5
plasma)				
Glucose	1572+62	156 + 14 9	190 2 + 18 7	146 2 + 9 2
(mg/dL de sang)	107,2 ± 0,2	100 ± 14,9	130,2 ± 10,7	170,2 ± 3,2

Tableau 10 : Poids relatif des testicules et des vésicules séminales, concentrations plasmatiques de testostérone et glycémie de hamsters djungariens mâles exposés au véhicule (swPL + veh), 5 (swPL + BPA 5) ou 500 (swPL + BPA 500) μg/kg/jour de BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue, ou maintenus constamment en photopériode longue (PL + veh).

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne \pm SEM de n = 10-12 hamsters/groupe. Pour vérifier l'effet photopériodique, les comparaisons entre les groupes de mâles exposés au véhicule en PL et en swPL ont été analysées à l'aide de tests t (*a*, p<0,001). Les comparaisons entre les mâles exposés au BPA et au véhicule en swPL ont été analysées à l'aide de l'ANOVA à un facteur. swPL = retour en photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) pendant 10 semaines après une adaptation de 11 semaines en photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = Bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 43 : Expression en ARNm ou protéine de TSHβ dans la *pars tuberalis*, Dio3 et vimentine dans les tanycytes, Rfrp dans l'hypothalamus dorso-médian et Kisspeptine, Pomc et Somatostatine dans le noyau arqué de hamsters djungariens mâles exposés au BPA pendant 10 semaines de retour en photopériode longue.

L'expression de *TSHβ*, *Dio2*, *Rfrp3*, *Pomc* et *Somatostatine* a été évaluée par hybridation *in situ* non radioactive et celle de Kisspeptine et Vimentine par immunohistochimie. Les hamsters mâles ont été exposés par l'alimentation au véhicule (swPL + veh), 5 (swPL + BPA 5) ou 500 µg/kg/jour de BPA (swPL + BPA 500) pendant 10 semaines de retour en photopériode longue (swPL), ou ont été maintenus en photopériode longue avec une alimentation véhicule (PL + veh). Les données sont indiquées en valeurs individuelles et en moyenne \pm SEM de n = 6-12 hamsters/groupe. Lorsque cela était possible, l'effet photopériodique a été vérifié en comparant les groupes véhicules PL et swPL par des tests-t (*a*, p<0,05). Les comparaisons entre les mâles exposés au BPA et au véhicule en swPL ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur et de tests *post hoc* de Dunn pour les comparaisons multiples ou de tests-t (*, p<0,05). swPL = retour à une photopériode longue (PL = 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) après une adaptation de 11 semaines à une photopériode courte (PC = 8 heures de lumière/16 heures d'obscurité), BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

Discussion

Les effets et mécanismes d'action des PE tels que le BPA sur la reproduction et le métabolisme énergétique sont surtout investigués chez des animaux de laboratoire traditionnels (rats, souris) afin de répondre aux préoccupations des effets qu'ils peuvent avoir sur la santé humaine. Pourtant, du fait de leur caractère omniprésent dans l'environnement, les PE contaminent toutes les espèces. Chez les mammifères saisonniers, la régulation photopériodique de la reproduction et du métabolisme énergétique repose sur des mécanismes neuroendocriniens qui pourraient être sensibles à l'action des PE.

Dans cette étude, j'ai montré que l'exposition orale au BPA de hamsters djungariens mâles et femelles pouvait altérer la cinétique d'adaptation de paramètres physiologiques et neuroendocriniens à des changements de photopériode, mais n'affectait pas l'intégrité des adaptations physiologiques au message photopériodique *in fine*.

1. L'exposition au BPA a des effets mineurs sur l'intégration du message photopériodique

Le rôle de la TSH tubéralienne dans la transmission de l'information photopériodique portée par la mélatonine étant maintenant bien documenté chez les mammifères, l'influence de l'exposition au BPA sur l'intégration du message photopériodique a été analysée. À la fin du transfert en PC, tous les hamsters mâles et femelles ont présenté des niveaux réduits de TSH, quelle que soit la dose d'exposition. Ceci suggère que le BPA n'altère pas l'inhibition de la TSH médiée par l'allongement du pic nocturne de mélatonine en jours courts. Lors du transfert en swPL, l'exposition du BPA des hamsters femelles n'a pas altérée l'augmentation de la TSH induite par la PL. En revanche, les mâles exposés à 5µg/kg/jour de BPA ont présenté des niveaux réduits de TSH par rapport au groupe contrôle suggérant que l'exposition à cette dose de BPA altère l'intégration de la PL par la TSH tubéralienne. Ce résultat pourrait résulter d'un effet du BPA soit sur le message mélatoninergique (potentiellement sa synthèse, son transport ou sa dégradation) en rendant l'hormone biodisponible plus longtemps lors des nuits de PL, ce qui induirait une réduction consécutive de la synthèse de TSH ; soit directement sur la synthèse de TSH ou indirectement via l'expression des récepteurs MT1 dans la pars tuberalis. Les effets du BPA sur la mélatonine sont méconnus, puisque la majorité des études expérimentales évaluant les effets du BPA reposent sur des modèles murins déficients en mélatonine ou ne sont pas réalisées dans des contextes saisonnières/photopériodiques. Néanmoins, bien que l'exposition au BPA lors du transfert en swPL a entraîné une diminution significative de l'expression de TSH chez les mâles ceci n'a pas induit une altération de l'expression de la vimentine et la Dio2 dans les tanycytes. De plus, cette diminution de la TSH tubéralienne n'a pas été associée à une perturbation des réponses physiologiques métaboliques et reproductives.

2. <u>Le BPA perturbe la cinétique des réponses physiologiques aux changements</u> photopériodiques

a. Effet du BPA sur la régulation photopériodique du métabolisme énergétique

Dans les deux protocoles de changement photopériodique réalisés, la cinétique d'adaptation métabolique des hamsters djungariens, en terme de variation du poids corporel et d'efficacité alimentaire était impactée par l'exposition au BPA, avec des effets variables en fonction de la dose d'exposition, de la photopériode et du sexe. En effet, l'exposition au BPA lors du transfert en PC a ralenti l'acquisition du phénotype métabolique des femelles exposées à 500 μ g/kg/jour et l'a accéléré chez les mâles exposées à 5 μ g/kg/jour, et l'exposition à 5 ou 500 μ g/kg/jour BPA lors du transfert en swPL a accéléré l'acquisition du phénotype métabolique chez les femelles.

Le BPA a été rapporté pour être une substance obésogène dans de multiples études *in vitro* et *in vivo* et son exposition a été associée à des risques d'obésité et de diabète de type 2 chez l'humain (Angle *et al.*, 2013 ; Oliviero *et al.*, 2022). L'observation que les femelles hamsters djungariens exposées au BPA montrent un ralentissement de la perte de poids corporel et de la diminution de l'efficacité alimentaire lors du transfert en PC, ainsi qu'une accélération du gain de poids corporel et de l'augmentation de l'efficacité alimentaire en swPL est donc cohérente avec cet effet obésogène du BPA.

Le ralentissement de la perte de masse corporelle des hamsters femelles, observé par l'exposition à 500 µg/kg/jour de BPA lors du transfert en PC, pourrait être dû à la diminution de l'expression de la Somatostatine observée dans l'ARC à 10 semaines de PC. Peu d'études rapportent une perturbation de l'axe somatotrope par le BPA. Néanmoins il a été proposé que le BPA peut altérer les activités de liaison d'un sous-type de récepteur de la somatostatine dans le cerveau du rat (Facciolo et al., 2002) et a une action inhibitrice sur la synthèse et la libération in vitro de l'hormone de croissance (GH), probablement par le biais d'une altération des systèmes de transduction des signaux cellulaires de la GHRH (Katoh et al., 2004). Il serait intéressant d'investiguer si, en altérant l'expression de la somatostatine dans l'ARC, le BPA a pu perturber l'expression d'autres éléments de l'axe de croissance en aval, tels que la GH dans les cellules somatotrophes de l'hypophyse et l'IGF-1 dans le foie. La régulation saisonnière de la somatostatine est également assez peu comprise mais elle semble impliquer la signalisation TSH/T3 (Klosen et al., 2013). Les effets de l'exposition au BPA sur l'expression de la somatostatine ne sont probablement pas médiés par une perturbation de la TSH tubéralienne puisque son expression dans la pars tuberalis n'a pas été affectée par l'exposition au BPA dans ce groupe de femelles. De plus, les autres éléments hypothalamiques répondants en aval au signal de la TSH (vimentine tanycytaire, déiodinases) n'ont pas été affectés non plus par le BPA. Une hypothèse serait que le BPA altère d'autres régulateurs de l'expression de la somatostatine, par exemple les récepteurs ERa présents dans une petite population des neurones à somatostatine de l'ARC (Scanlan et al., 2003).

L'accélération du gain de poids corporel et la meilleure efficacité alimentaire, observées lors de l'exposition à 5 μ g/kg/jour de BPA de femelles hamsters lors du transfert en swPL, sont associées à une réduction de l'expression du neuropeptide anorexigène *Pomc* dans l'ARC qui pourrait ainsi participer à l'accélération du phénotype « obésogène » du swPL. Les effets du BPA sur les neurones à POMC sont relativement peu étudiés mais il semblerait que le BPA puisse perturber leur activité. *In vitro*, des études rapportent des variations contradictoires de l'expression de POMC induite par l'exposition au BPA (Desai *et al.*, 2018 ; Salehi *et al.*, 2019). Néanmoins, *in vivo*, l'exposition au BPA induit une réduction du nombre de projections des neurones à POMC vers le PVN (Mackay *et al.*, 2013). Chez les hamsters djungariens, l'effet du BPA sur l'expression de POMC pourrait être médié par une perturbation antagoniste directe de la T3 qui a été montrée capable d'induire l'expression de *Pomc* en se fixant aux TR β 1 des neurones à POMC (Bao *et al.*, 2019). Un effet indirect du BPA peut aussi être envisagé par le biais d'une perturbation de la leptine, puisque le BPA peut désensibiliser la réponse des neurones à POMC à la leptine (Mackay *et al.*, 2017).

En regard de cet effet obésogène reconnu du BPA, l'accélération de la perte de poids corporel et de la diminution de l'efficacité alimentaire induite par l'exposition à 5 μ g/kg/jour de BPA chez les hamsters mâles transférés en PC est plutôt surprenante même si, chez l'humain, l'exposition au BPA est parfois associée à une réduction des indices de masse corporelle (Harley *et al.*, 2013). De façon intéressante, cette exposition à 5 μ g/kg/jour de BPA chez les hamsters mâles a aussi induit une augmentation du ratio glucose/insuline par rapport aux mâles contrôles, suggérant une augmentation de la sensibilité à l'insuline et un renforcement de l'effet anorexigénique central de l'insuline (Kauffman et Castracane, 2003). En effet, l'insuline est capable d'activer les neurones anorexigéniques à POMC (Qiu *et al.*, 2018) et d'inhiber les neurones orexigéniques à NPY (Lee et Herzog., 2021). Dans cette expérience, l'expression de la POMC n'a pas été altérée par l'exposition au BPA mais il serait intéressant d'investiguer celle du NPY pour comprendre si l'effet est médié centralement par les circuits de contrôle de la prise alimentaire.

b. Effet du BPA sur la régulation photopérioque de la reproduction

Concernant l'effet de l'exposition au BPA sur la cinétique d'adaptation de la réponse reproductive à la photopériode, seules les femelles exposées à $5 \mu g/kg/jour$ lors du transfert en swPL ont été impactées avec une accélération de la prise de poids de l'utérus et des ovaires associée à une avance de la diminution de la kisspeptine dans l'ARC par rapport aux femelles du groupe contrôle. Le BPA pourrait induire cet effet en réactivant précocement la voie TSH/Dio2/T3. Toutefois, à la 5^{ème} semaine de swPL, l'expression de la TSH et de la Dio2 était encore relativement faible et similaire au groupe contrôle, même s'il ne faut pas exclure que le BPA ait pu induire l'expression de la TSH plus tôt, dès les premières semaines du swPL. La réactivation précoce de l'axe reproducteur des femelles

exposées au BPA pourrait aussi être expliquée par un effet oestrogénique du BPA cumulé à la réactivation de l'axe gonadotrope par la photopériode longue. Le BPA pourrait induire une sensibilisation précoce du système reproducteur aux œstrogènes circulants, déjà élevés à la 5^{ème} semaine de swPL, en augmentant notamment l'expression des ER dans l'utérus et dans l'hypothalamus. L'augmentation du rétrocontrôle négatif des œstrogènes sur les ER dans les neurones à kisspeptine de l'ARC pourrait expliquer sa diminution précoce. Cette hypothèse d'un effet du BPA médié par les ER pourrait être vérifiée par des co-marquages ER α /ER β et kisspeptine dans l'ARC et une quantification de l'expression des ER par RT-PCR dans l'utérus et les ovaires.

La cinétique d'adaptation de la réponse reproductive aux changements de photopériode n'a pas induit d'effet sur les paramètres mesurés chez les hamsters mâles. Cependant, chez les mâles exposés à 5 μ g/kg/jour de BPA lors du transfert en swPL une réduction du nombre de neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus dorso-médian, associée à une baisse de la TSH dans la *pars tuberalis* est observée. Ces données suggèrent que le BPA diminue le nombre de neurones à RFRP-3 suite à une perturbation de la régulation de T3 hypothalamique par la TSH, bien que l'expression de *Dio2* n'ait pas varié par rapport aux mâles contrôles.

c. Effet du BPA sur la régulation photopérioque de la reproduction

L'exposition à 5 ou 500 µg/kg/jour de BPA lors du transfert en PC a modifié la cinétique de régulation du pelage chez les hamsters mâles et femelles. Le BPA pourrait perturber l'expression ou l'action des potentielles tubéralines ou, en amont, l'activité des cellules lactotropes hypophysaires. Un changement de couleur du pelage, médié par une réduction de la méthylation du gène *agouti* dans les cellules germinales, a déjà été observé chez des souris Agouti exposées au BPA (Dolinoy *et al.*, 2007). Le protocole de suivi longitudinal de la coloration du pelage montre cependant que cet effet du BPA est transitoire, puisqu'observé uniquement à 2 semaines de PC pour les femelles et à 8 semaines de PC pour les mâles.

3. Les effets du BPA sur l'intégration photopériodique varient en fonction du sexe

Le BPA induit des effets différents sur la cinétique d'adaptation des réponses physiologiques entre les mâles et les femelles hamsters. Lors du transfert en PC, le BPA a accéléré l'intégration du phénotype métabolique chez les mâles tandis qu'il l'a ralenti chez les femelles. Lors du transfert en swPL, l'effet accélérateur du BPA sur la réactivation de l'axe reproducteur et métabolique a été observé chez les femelles et non chez les mâles. Ceci peut s'expliquer par un dimorphisme sexuel de la physiologie des fonctions de reproduction et du métabolisme énergétique. Par exemple, les femelles présentent une sensibilité plus importante aux effets anorexigènes de la leptine et une sensibilité diminuée à ceux de l'insuline par rapport aux mâles (Shi *et al.*, 2008, 2009) et les neurones à kisspeptine sont plus nombreux dans l'AVPV de femelles que des mâles (Kaufmann *et al.*, 2007).

Un dimorphisme sexuel de la physiologie saisonnière peut également expliquer les effets différentiels du BPA. Ce dimorphisme est beaucoup moins étudié, même si une étude a montré une période de gain de poids corporel plus longue chez le bélier par rapport à la brebis (LeBlanc *et al.*, 2001). De façon intéressante, l'analyse comparée des diverses variables biologiques mesurés chez les hamsters djungariens contrôles (non exposés au BPA) transférés en PC et en swPL a permis de montrer un dimorphisme sexuel marqué de plusieurs paramètres neuroendocriniens et physiologiques (figure 43). Ainsi, les variations d'expression de kisspeptine, POMC et de TSH en PC et celles de la vitesse de gain de poids corporel et d'expression de POMC et de RFRP en PL contribuent à induire de la variabilité entre les femelles et les mâles.



Figure 44 : Analyse en composantes principales des paramètres neuroendocriniens et physiologiques évalués en PC (A) et swPL (B) chez les hamsters djungariens mâles et femelles contrôles.

Ainsi, un dimorphisme sexuel dans le contrôle de la reproduction et du métabolisme énergétique et dans la physiologie saisonnière pourraient être à l'origine des différences liées au sexe dans les effets observés de l'exposition au BPA.

4. Les effets du BPA sur l'intégration photopériodique varient en fonction de la dose

Les effets majeurs du BPA ont principalement été observés lorsque les hamsters étaient exposés à 5 μ g/kg/jour (en PC chez les mâles et en swPL pour les deux sexes). Ce résultat corrobore les effets à faibles doses classiquement rapportés pour les PE et notamment le BPA (Vandenberg, 2014). De plus, ces effets à faible dose n'ont pas été forcément prédictifs d'effets néfastes à plus hautes doses puisque, pour un même protocole photopériodique et un même sexe, l'exposition au BPA à 50 ou 500 μ g/kg/jour n'induisait pas forcément d'effets.

Toutefois, les femelles (mais pas les mâles) exposées à 500 µg/kg/jour en PC ont également présenté une altération de la cinétique d'apparition du phénotype métabolique. Cet effet à une dose relativement forte lors du transfert en PC peut suggérer que l'inactivation graduelle des systèmes endocriniens (diminution du nombre/inactivation des récepteurs hormonaux) induite par la PC renforce la compétition entre les hormones endogènes et le BPA sur les récepteurs sur lesquels il agirait. Dans ce cas, de plus fortes doses de BPA seraient nécessaires pour aboutir à un effet.

5. Conclusion, limites et perspectives sur l'effet du BPA sur l'intégration photopériodique

L'exposition au BPA perturbe les cinétiques d'acquisition des réponses physiologiques aux changements de photopériode, mais n'a pas altéré l'intégrité des adaptations physiologiques finales. En effet, les hamsters exposés au BPA ont présenté des réponses physiologiques attendues à la fin des protocoles de transfert photopériodique, que ce soit en terme de changement de masse corporelle et de l'efficacité alimentaire, de la modification de la masse des organes reproducteurs et des concentrations circulantes des stéroïdes sexuels, et du changement de couleur du pelage. Une conclusion similaire a été donnée par Corbitt et coll (2007) qui ont observé qu'une alimentation enrichie en phyto-oestrogènes retardait la croissance de la protubérance cloacale des oscines en réponse à un transfert en photopériode longue, mais sans altérer le phénotype reproducteur en fin d'étude.

Puisque nos résultats montrent que le BPA provoque surtout des effets transitoires sur les adaptations physiologiques à la photopériode, il aurait été intéressant d'utiliser des paramètres d'évaluation plus longitudinaux permettant de suivre précisément la dynamique des effets du BPA (par exemple, suivi *in vivo* de la fermeture/réouverture vaginale et du volume testiculaire en PC/swPL, prélèvements répétés de sang par canulation ou microprélèvement). De même, les analyses des tissus prélevés à 10 semaines de PC/swPL ont permis de rendre compte de l'état des systèmes nerveux et endocriniens qu'à la fin de l'intégration photopériodique, une information néanmoins indispensable pour conclure sur les effets du BPA sur l'adaptation complète des réponses saisonnières.

Il serait intéressant d'analyser ces systèmes neuroendocriniens reproducteurs et métaboliques à différents moments du transfert photopériodique pour mieux comprendre comment le BPA agit sur la dynamique de la mise en place des réponses physiologiques au changement de photopériode.

Une autre limite de cette expérience est le protocole de la mesure de la prise alimentaire. En effet elle a été réalisée sur des animaux hébergés collectivement, présentant donc des comportements alimentaires influencés par les comportements sociaux, et la consommation d'aliments a été moyennée par le nombre d'animaux par cage (parfois variable). Ainsi, l'efficacité alimentaire ne reflète donc pas directement la consommation alimentaire d'un individu et il serait intéressant de suivre les prises alimentaires individuelles chez des animaux hébergés en cage individuelle.

Finalement, les prélèvements sanguins n'ont pas été réalisés à jeûn, ce qui peut induire une variabilité dans la concentration plasmatique en insuline liée à la variabilité de la prise alimentaire précédent les prélèvements. Pour pallier à ce problème, la concentration d'insuline a été normalisée par rapport au glucose sanguin mais il aurait été préférable de faire des prélèvements à jeûn.

L'exposition au BPA a été évaluée sur un transfert unique en PC ou en PL mais il aurait été intéressant d'évaluer si les modifications dues à cette exposition au BPA a entrainé des effets à plus long terme, c'est-à-dire sur l'adaptation suivante à un nouveau changement de photopériode. Ainsi, il est possible que la diminution de la TSH observée chez des mâles exposés à 5 μ g/kg/jour lors du transfert en swPL puisse altérer l'intégration consécutive d'une PC.

Les transitions photopériodiques à l'âge adulte constituent des périodes avec de forts changements neuroendocriniens pouvant être particulièrement sensibles à l'action des PE. Cependant les périodes prénatales, néonatales et lactationnelles sont également des fenêtres critiques de vulnérabilité aux PE dont les effets à long-terme sont également à évaluer chez les espèces saisonnières.

Projet 2 : Evaluation des effets somatoendocriniens d'une exposition au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle au cours du cycle biologique du hamster djungarien.

Matériel et méthodes

1. Animaux

Ce projet a reçu une évaluation et validation éthique de la part du comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg et du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (Apafis#22595-2019102317455140).

Cette expérience a nécessité de réaliser et suivre des accouplements de hamsters djungariens mâles et femelles nés et élevés au sein du Chronobiotron (UMS 3415, Strasbourg) et âgés en moyenne de 4 mois au moment des accouplements. Deux séries d'accouplement ont été réalisées afin d'obtenir un nombre de petits suffisant pour réaliser les expériences ultérieures envisagées. La première reproduction a été lancée en août 2021 et la seconde en septembre 2021. Pour chaque accouplement, un mâle a été placé pendant 7 jours avec une femelle dans une cage de type II L et chaque hamster était identifiable par lecture d'une puce sous-cutanée (1,4x8 mm) RFID (Biolog-Tiny). Chaque cage était enrichie en coton de nidation, bâtonnet en bois à ronger et tunnel en acier inoxydable. L'eau et la nourriture étaient disponibles *ad libitum*. La température dans les pièces était de $22^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ et la lumière était allumée pendant la période diurne et passait en lumière rouge en période nocturne. Pendant l'accouplement et la croissance des petits jusqu'au sevrage, les animaux ont été hébergés dans une pièce exposée à une PL de 16h de lumière/8h d'obscurité. Afin de limiter les phénomènes d'agressions observés au cours du premier projet et de mesurer précisément la prise alimentaire de chaque animal, les petits ont été isolés. Ainsi, au moment du sevrage (à 28 jours post-natal), chaque petit a été placé dans une cage individuelle de type II L enrichie en coton, bâton à ronger et tunnel. Cette procédure d'isolement a fait l'objet d'un avenant à la saisine validé par le comité d'éthique et le ministère.

Les mêmes mesures décrites dans le premier projet ont été prises au sein de l'animalerie pour minimiser l'exposition des hamsters aux contaminants chimiques environnants. Les animaux en reproduction et en croissance ont eu accès à une nourriture complète végétale à faible teneur en phytoœstrogènes (SAFE® 150), puis à partir du sevrage, ils ont été habitués à un régime alimentaire de maintien, également faible en phyto-œstrogènes (7011P, Altromin International).

2. Protocole expérimental

L'objectif de cette expérience a été d'évaluer les effets d'une exposition à 5 μ g/kg/jour de BPA ou du véhicule lors de la période gestationnelle et lactationnelle sur les capacités de reproduction, le comportement maternel, la croissance et l'apparition de la puberté des petits, ainsi que leur capacité à long-terme à adapter leur physiologie à des changements photopériodiques. À l'âge adulte (6-7 mois), une partie des petits, comprenant 20 mâles et 15 femelles exposés ou non au BPA en période gestationnelle et lactationnelle, a été mise à mort afin de prélever les tissus et analyser la physiologie des systèmes reproducteur et métabolique. Une autre partie des petits (comprenant 17 mâles et 16 femelles exposés ou non au BPA en période gestationnelle et lactationnelle) a été transférée à 6 mois d'âge, en PC. Pendant 12 semaines de PC, leur capacité à intégrer le changement de message photopériodique a été évaluée en suivant leur perte de poids corporel, leur prise alimentaire, la variation de leur pelage et leur quiescence reproductive. Les hamsters ont été mis à mort après 12 semaines de PC (figure 44).



Figure 45 : Protocole expérimental évaluant les impacts de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur la fertilité et le comportement maternel, la croissance et la puberté des petits et leur capacité à l'âge adulte à adapter leur physiologie à un transfert en photopériode courte.

Plusieurs analyses somatiques, endocrines et génétiques ont été réalisées ou sont en cours d'analyse. PL = photopériode longue (16h de lumière/8h d'obscurité), PC = photopériode courte (8h de lumière/16h d'obscurité), EVT = estimation du volume testiculaire, SPB = séparation balano-préputiale, LC-MS/MS = chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

3. Exposition orale au BPA des femelles lors de l'accouplement, la gestation et la lactation

Afin de mieux contrôler la dose administrée et de maintenir une administration par voie orale plus représentative de l'exposition naturelle aux perturbateurs endocriniens, chaque femelle a reçu quotidiennement un morceau de 200 mg de gelée contenant soit 0,05% d'éthanol (contrôle véhicule), soit 5 μ g/kg/jour de BPA. L'exposition a été réalisée chez chaque mère du premier jour de l'accouplement jusqu'au 15^{ème} jour post-natal.

Tous les 5 jours, la gelée a été préparée en mélangeant 1 g d'agar-agar et 2 g de croquettes réduites en poudre avec 100 ml d'eau potable. Afin de dissoudre l'agar-agar, le mélange a été porté à ébullition au micro-onde pendant 1 min, puis mis sous agitation sur une plaque légèrement chaude

pendant 20 min. Une fois le mélange refroidi à 45°C, 50 μ l d'une solution diluée de BPA ou d'éthanol 100% ont été ajoutés à la solution d'agar-agar et laissé sous agitation à 45°C (pour maintenir la solution à l'état liquide tout en évitant la dégradation thermique du BPA) pour 15 min supplémentaires. La solution a été versée dans une boîte de pétri en verre et s'est gélifiée en refroidissant. Des cubes de 1x1x0,3cm ont été découpés à partir de la plaque de gelée à l'aide d'un emporte-pièce en acier inoxydable puis chaque cube a été découpé en deux pour obtenir un morceau de 200 mg de gelée. Les morceaux de gelée ont été stockés dans des boîtes de pétri en verre pendant 5 jours maximum à +4°C.

Tous les 5 jours, le volume de BPA et d'éthanol à ajouter dans la solution d'agar-agar a été calculé en tenant compte du poids corporel moyen des femelles gestantes.

Pour un morceau de gelée de 200 mg :

quantité de BPA(
$$\mu g$$
)/morceau gelée = q = $\frac{5 (\mu g) x \text{ poids corporel moyen}(g)}{1000 (g)}$

Soit pour une plaque de 85g :

quantité de BPA (
$$\mu g$$
)/plaque = q(plaque) = $\frac{q x (85x1000)}{200}$

La solution-mère de BPA a été diluée dans l'éthanol en fonction de la quantité de BPA calculée pour chaque plaque et du volume final d'injection dans la solution d'agar-agar :

Solution – mère (µg de BPA/ml d'éthanol) =
$$\frac{q(plaque) \times 1000}{50 (µl)}$$

Pour éviter un effet synchronisateur de l'administration, la gelée a été dispensée quotidiennement à un horaire aléatoire et variable, en déposant le morceau de gelée sur un verre de montre devant la femelle. Pendant les 7 premiers jours d'administration, un séparateur a été introduit dans la cage au moment de l'administration afin de séparer temporairement la femelle du mâle (figure 45). À chaque administration, la consommation de la gelée par la femelle a été vérifiée visuellement. De façon générale, les gelées, qu'elles contiennent du BPA ou de l'éthanol, ont toujours été entièrement et rapidement (en moins de 5 min) ingérées par les femelles.



Figure 46 : Illustration schématique de la préparation des morceaux de gelées contenant du BPA ou l'éthanol distribués aux femelles hamsters lors de l'accouplement, la gestation et la lactation. BPA = bisphénol A

Afin de vérifier l'efficacité du mode d'administration et l'absence de contamination des mères exposées au véhicule, à l'issue du sevrage des petits, les mères ont été exposées à nouveau au BPA/véhicule par ingestion orale quotidienne sur une période de 7 jours (l'exposition expérimentale étant arrêtée au bout du 15^{ème} jour de lactation). Le sang maternel a été prélevé 1 h après l'ingestion orale du dernier morceau de gelée et le BPA-glucuronide plasmatique a été dosé. Ce délai a été choisi après une étude préliminaire montrant que le BPA-glucuronide atteint ses concentrations plasmatiques maximales 1 h après l'ingestion du morceau de gelée. Pour cela, les mères ont été anesthésiées à l'isoflurane et guillotinées puis environ 1 ml de sang a été récupéré dans un tube hépariné sur glace. Le BPA glucuronide a été dosé par LC-MS/MS selon le protocole décrit dans le premier projet.

4. Suivis longitudinaux

a. Suivi de la gestation et des naissances

Les femelles mises en accouplement ont été pesées une fois par semaine pendant deux semaines après la mise en accouplement. Puis les pesées ont ensuite été interrompues afin de ne pas stresser les femelles potentiellement gestantes. La gestation durant en moyenne 18 jours chez le hamster djungarien, la survenue des naissances a été contrôlée en observant les cages quotidiennement et à deux reprises par jour, à partir du 15^{ème} jour post-accouplement. Ce double contrôle quotidien des cages a été maintenu deux semaines après les naissances afin de surveiller le bien-être des portées et noter les éventuels décès de petits.

b. Suivi du comportement maternel

Après la naissance des petits, le comportement maternel a été évalué sur deux sessions journalières d'une heure, aux jours lactationnels 2, 4, 7 et 14 par une méthode d'échantillonnage par balayage (*scan sampling*) (Palanza *et al.*, 2002 ; Catanase et Vandenberg, 2017 ; Franks *et al.*, 2011). Cette méthode consiste à observer le comportement ou l'activité de chaque mère à un instant donné, à intervalle régulier de 3 min sur une session de 1 h. Les deux sessions journalières ont été réalisées 1 h après l'allumage des lumières dans la pièce, et 1 h avant l'extinction des lumières.

A chaque instant d'observation, le comportement dans lequel la mère était momentanément engagée a été noté (exemple en figure 46). Les comportements observables sont définis dans le tableau 11 cidessous.

Comportement	Description		
Allaitement (nursing)	La mère se place au-dessus des petits pour les réchauffer et/ou leur permettre de téter		
Léchage/toilettage	La mère lèche les petits (corps et région ano- génitale)		
Contact avec les petits	La mère est en contact avec les petits mais dans une position qui ne permet pas d'allaiter (par exemple, elle est installée à côté des petits dans le nid)		
Construction du nid	La mère ramasse des morceaux de coton et les ramène au nid ou déplace la litière vers le nid avec son museau		
Auto-toilettage	La mère se lèche (peut arriver lorsqu'elle toilette les petits)		
Manger	La mère mange		
Boire	La mère boit		
Aucun contact avec les petits	La mère est hors du nid, n'a pas de contact avec les petits et n'est pas engagée dans les comportements cités ci-dessus		

Tableau 11 : Comportements maternels observés par la méthode d'échantillonnage par balayage d'après Franks *et al.*, 2011.

Ainsi, en observant le comportement momentané de chaque mère toutes les 3 min pendant une session de 1 h, 21 comportements par mère par session ont été recueillis, soit 42 comportements par mère par jour. Pour simplifier l'analyse, les observations ont été divisées en deux catégories : les comportements de soins, dirigés vers les petits (allaitement, léchage, contact avec les petits, construction du nid) et les comportements en dehors du nid, non-dirigés vers les petits (auto-toilettage, manger, boire, aucun contact avec les petits). Les données ont été exprimées en pourcentage de fréquence au cours des 4 jours évalués.

DATE	10-0ct	
TIME	11AM	
OBSERVER	Frances	
Litter ID	A.1	A.2
0	×	Ν
3	×	N
6	×	N
9	×	NG
12	x	NG
15	E	NG
18	E	NS
21	E	NS
24	D	NG
27	D	N
30	×	С
33	x	х
36	×	х
39	СВ	Х
42	С	х
45	С	E
48	N	E
51	NG	E
54	N	В
57	A	B

Figure 47 : Illustration d'une feuille d'observation complétée lors d'une session de 1 h d'observation de comportement maternel par la méthode d'échantillonnage par balayage, d'après Franks *et al.*, 2011.

À l'aide d'un code, les comportements de deux mères (A.1 et A.2) observés toutes les 3 min pendant 1 h ont été notés. X = pas de contact avec les petits, E = manger, D = boire, C = contact avec les petits, B = construction du nid, N = allaitement, G = toilettage, A = allaitement actif (la mère est activement arquée sur les petits), S = auto-toilettage

5. Suivi du développement métabolique et reproducteur des petits

Au 28^{ème} jour post-natal, le sexe des petits a été déterminé, ils ont été pesés pour la première fois et isolés dans des cages individuelles.

a. Croissance et prise alimentaire

Chaque semaine, le poids corporel et la prise alimentaire ont été relevés. Les données de poids corporel sont exprimées en pourcentage à partir du jour post-natal 28 (=100%) et la prise alimentaire a été ramenée au poids corporel de chaque individu et divisée par le nombre de jours entre deux mesures.

b. Puberté

Entre la 5^{ème} et 11^{ème} semaine post-natale, l'apparition de l'ouverture vaginale des femelles et la séparation balano-préputiale (SPB) et le volume testiculaire (EVT) des mâles ont été observés, une fois par semaine, afin de définir le moment de la puberté (Butler *et al.*, 2007).

Chez les femelles, la date d'apparition de l'ouverture vaginale a été définie comme la première des deux semaines consécutives au cours desquelles l'orifice vaginal était ouvert et a permis de déterminer la date de la puberté.

Chez les mâles, le volume testiculaire a été estimé en mesurant la largeur et la longueur des testicules des mâles brièvement anesthésiés à l'isoflurane (anesthésie gazeuse). Au niveau du testicule gauche, on a humidifié les poils avec un coton imbibé d'eau tiède pour qu'ils ne gênent pas la mesure, puis le testicule a été immobilisé à travers la peau à l'aide d'une pince courbe afin de pouvoir mesurer sa largeur et sa longueur avec un pied à coulisse électronique. L'EVT a ensuite pu être calculé avec la formule suivante :

$EVT (mm3) = (largeur testicule)^2 x (longueur testicule)$

Dans un même temps, la séparation balano-préputiale définie comme la disparition du feuillet balano-préputial qui unit prépuce et gland en période pré-pubertaire, a été observée. La puberté des mâles a été définie comme l'âge auquel l'EVT >100 mm³ et la séparation balano-préputiale complète étaient évidents. Le choix du seuil d'EVT est expliqué dans l'annexe 4, qui détaille les résultats d'une étude préliminaire corrélant les EVT aux poids testiculaires et concentrations circulantes de testostérone.

c. Calorimétrie indirecte

À 6 mois d'âge, des femelles exposées au BPA (n = 8) ou au véhicule (n = 8) pendant la gestation et la lactation ont été placées pendant 72 h dans des cages métaboliques (Phenomaster, TSE Systems). Cette expérience a permis d'évaluer la dépense énergétique en temps réel, par calorimétrie indirecte, *via* la mesure simultanée de la consommation en O₂ (VO₂) et la production de CO₂ (VCO₂).

La mesure de la dépense énergétique par la calorimétrie indirecte repose sur le principe de base que la libération d'énergie par l'organisme résulte de l'oxydation des nutriments (protéines, lipides, glucides) qui utilise de l' O_2 et produit du CO₂. La dépense énergétique est calculée par l'équation fondamentale de De Weir à partir des valeurs mesurées de VO₂ et VCO₂ sachant qu'un litre d'O₂ consommé génère 3,9 kcal et un litre de CO₂ produit génère 1,1 kcal (Weir, 1949):

Dépense énergétique
$$(kcal/h) = (3, 9x(VO2) + 1, 1x(VCO2)) \times 1, 44$$

La calorimétrie indirecte permet aussi de calculer le quotient respiratoire qui représente le rapport entre le volume de CO_2 produit par l'oxydation totale d'un substrat sur le volume d'oxygène nécessaire à l'oxydation. Ce quotient indique quel type de nutriments est oxydé pour produire de l'énergie, tendant vers 1 lorsque les glucides sont principalement oxydés ; 0,8 pour les protéines ou 0,7 pour les lipides (Even et Nadkarni, 2012) :

$$Quotient respiratoire = \frac{VCO2}{VO2}$$

Le dispositif se compose de 4 cages individuelles de type II L équipées de capteurs de gaz, dans lesquelles les hamsters ont été hébergés et d'une cage vide permettant d'échantillonner l'air de référence. Quatre séries d'enregistrement ont été réalisées pour obtenir les données de 16 femelles. Lors de chaque série d'enregistrement, les mesures ont été réalisées simultanément sur des femelles issues des deux groupes expérimentaux (véhicule ou BPA). Dans chaque cage et par intervalle de 5 min, le dispositif a séquentiellement échantillonné l'air à un flux de 0,4 l/min, pesé la nourriture par des capteurs fixés au sommet de la mangeoire et mesuré l'activité locomotrice ambulatoire par un réseau de faisceaux infrarouges balayant les plans XY. Ainsi, les échanges gazeux et les activités locomotrices et alimentaires de chaque hamster ont été mesurés toutes les 25 min pendant environ 72 h consécutives.

Les données ont été analysées à l'aide de l'outils d'analyse en ligne CalR (version 1.3, Mina *et al.*, 2018) spécialisé dans l'analyse des données de calorimétrie indirecte. Les paramètres métaboliques ont été analysés sur une fenêtre de 64 h excluant les 6 premières heures d'enregistrement pendant lesquelles l'animal s'est habitué à la nouvelle cage. Des données de la littérature recueillies sur des hamsters djungariens testés dans des dispositifs de calorimétrie indirecte ont montré que les 16 premières heures de test ne diffèrent pas des jours d'enregistrement suivants, suggèrant qu'une période d'habituation n'est probablement pas nécessaire pour cette espèce (Borniger *et al.*, 2016 ; Warner *et al.*, 2010). Les hamsters ont été pesés immédiatement avant l'enregistrement, et cette valeur de poids corporel a été utilisée comme co-variable dans les analyses statistiques ultérieures. Les mesures ont été moyennées par heure puis par période journalière (phase diurne et phase nocturne).

6. <u>Suivi du poids corporel, de la prise alimentaire, du changement de pelage et de l'activité</u> reproductrice au cours du transfert en photopériode courte

À 6 mois d'âge une partie des petits mâles et femelles exposés au BPA/véhicule pendant la période gestationnelle et lactationnelle ont été transférés pendant 12 semaines en PC.

Chaque semaine, le poids corporel et la prise alimentaire ont été relevés. Les données de poids corporel sont exprimées en pourcentage à partir du premier jour en PC (= 100%) ou en perte de poids corporel par soustraction des valeurs brutes obtenues à la $12^{\text{ème}}$ semaine de PC aux valeurs mesurées au

1^{er} jour de PC. La prise alimentaire a été ramenée au poids corporel de chaque individu, divisée par le nombre de jours entre deux mesures, et cumulée sur les 12 semaines.

Les changements de pelage ont été évalués par les index de Figala (Figala *et al.*, 1973) décrits précédemment dans le premier projet, de la $6^{\text{ème}}$ à la $12^{\text{ème}}$ semaine de PC. Le moment de la transition vers le pelage « hivernal » induit par la PC a été déterminé comme la semaine à partir de laquelle les hamsters arboraient un pelage d'un stade >2. Ce seuillage de stade a permis de comparer le moment de la transition vers le pelage hivernal entre les groupes. Le stade final de pelage a aussi été comparé entre les groupes expérimentaux à la $12^{\text{ème}}$ semaine.

La quiescence reproductive a été suivie en observant l'apparition de la fermeture de l'orifice vaginal des femelles ainsi que la résorption de la séparation balano-préputiale et la régression du volume testiculaire des mâles. Ces paramètres ont été observés et mesurés de la même façon que celle décrite dans le paragraphe *5. b. Puberté*. Pour les femelles, le moment de la quiescence reproductive a été défini comme étant la semaine à partir de laquelle le vagin est resté fermé pendant au moins 3 semaines consécutives. Pour les mâles, le moment de la quiescence reproductive a été déterminé comme étant la semaine pour laquelle l'EVT< 100 mm³.

Selon les critères d'exclusion préalablement définis dans le premier projet, un mâle du groupe contrôle a été catégorisé comme photo non-répondant et exclu des analyses (score du pelage = 1,5; poids des testicules = 488,5 mg; perte de poids corporel à la fin de la PC = -2,4%).

7. Mise à mort et prélèvement des tissus des petits exposés au BPA ou au véhicule

L'ensemble des petits mâles et femelles, exposés au BPA/véhicule pendant la période gestationnelle et lactationnelle restés constamment en PL ou transférés en PC pendant 12 semaines, a été mis à mort à 7-9 mois d'âge, 4 h avant l'extinction des lumières. Les anesthésies, perfusions intracardiaques, prélèvements et stockages des cerveaux, des organes reproducteurs, du foie, de l'ensemble trachée-œsophage-glande thyroïde et du sang ont été effectués selon les méthodes décrites dans le premier projet.

8. Histologie des ovaires

Les ovaires des femelles exposées au BPA/véhicule en période gestationnelle et lactationnelle, maintenues en PL ou transférées en PC à l'âge adulte ont été coupés et colorés à l'hématoxyline et l'éosine afin d'analyser la fonctionnalité ovarienne par comptage des follicules. La préparation des ovaires et les colorations ont été réalisées par le Dr Béatrice Bothorel et Laetitia Jung.

a. Préparation des ovaires : enrobage, coupe, montage sur lames

Les ovaires déshydratés et stockés dans du butanol ont été rincés dans un bain de toluène pendant 30 min sous agitation. Ils ont ensuite été transférés dans un bain de paraffine (Histosec® pastilles, Merck) pour 3 h à 65°C (1 h dans un flacon fermé, 2 h dans un flacon ouvert) puis dans une nouvelle solution de paraffine pour 2 h à 65°C (flacon ouvert). Enfin, ils ont été placés dans des moules (Peel-A-Way®, Dutscher) préalablement équilibrés avec une solution de paraffine pendant 1 h. Les moules ont été sortis du four et se sont solidifiés à température ambiante.

Les blocs d'ovaire démoulés ont été coupés au microtome (Leica, RM2245) en sections fines de 5 μ m sur toute l'étendue de l'ovaire. Les rubans de coupes tissulaires ont été déposés dans des boîtes cartonnées conservées dans une pièce régulée en humidité et en température (25% d'humidité ± 10%, 21°C ± 1°C).

Des séries de rubans de 3 à 5 coupes, espacés entre eux de 100 μ m, ont été montés sur des lames gélatinées dans un milieu d'eau ultrapure maintenu à 45°C, de sorte à pouvoir analyser, pour chaque animal approximativement 10 coupes espacées de 100 μ m ± 20 μ m (figure 47). Les lames ont été séchées toute une nuit à 37°C puis stockées dans une boîte conservée dans une pièce régulée en humidité et en température (25% d'humidité ± 10%, 21°C ± 1°C).



Figure 48 : Illustration des rubans paraffinés de coupes d'ovaire montés sur lame.

Dans cet exemple, 4 séries de rubans contenant entre 3 et 4 coupes successivement espacées de 5μ m sont représentées. Les premières coupes de chaque bloc sont espacées de 100 μ m entre elles. Les comptages des follicules sont ensuite réalisés sur une seule coupe par série (dans cet exemple, les coupes sélectionnées pour le comptage sont indiquées par le triangle noir) et ne sont pas nécessairement effectués sur la première coupe du bloc selon l'état des coupes.

b. Coloration à l'hématoxyline et l'éosine

Principe

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) différencie les noyaux des cytoplasmes des cellules permettant de visualiser les éléments structurels des tissus au microscope. La combinaison du produit oxydé de l'hématoxyline, l'hématéine, avec un mordant métallique forme un colorant appelé « laque » chargé positivement et donc fortement affin pour les acides nucléiques présents dans les noyaux. L'éosine est un colorant anionique présentant une forte affinité pour les protéines chargées

positivement. Pour que l'absorption de l'éosine par les protéines cytoplasmiques soit maximale, le pH de la solution de coloration doit être en dessous du point isoélectrique des protéines ($pH \sim 6$) afin qu'elles soient chargées positivement. Dans un premier temps, la solution d'hématoxyline sur-colore la chromatine nucléaire dont l'excès est éliminé par un différenciateur (alcool acidifié). Les rinçages à l'eau bleuissent les noyaux et la solution d'éosine colore le cytoplasme en rose.

Protocole (Mark et al., 2007)

La composition des solutions utilisées est détaillée dans le tableau 12. Les lames ont été placées dans un four à 60°C pendant 5 min pour faire fondre la paraffine, puis ont été déparaffinées dans un bain de toluène (2x3 min). Les sections ont été réhydratées dans des bains d'alcool à degrés décroissants : 100° (2x3 min) – 95° (2x3 min) et dans un bain d'eau déminéralisée (3 min). Les sections ont été colorées avec la solution d'hématoxyline de Harris pendant 3 min, rincées à l'eau courante sous flux continu pendant 3 min, puis décolorées dans des bains rapides d'alcool acidifié (5 aller-retours de 2-3 sec). La coloration à l'hématoxyline a été bleuie par un rinçage à l'eau courante sous flux continu pendant 3 min. Les sections ont été colorées avec la solution d'hématoxyline a été bleuie par un rinçage à l'eau courante sous flux continu pendant 3 min. Les sections ont été colorées avec la solution d'éosine Y à 0,1% pendant 30 sec puis rincées à l'eau courante sous flux continu pendant 30 sec. Les sections ont été déshydratées par des bains successifs d'alcool 95° (2x2 min) – 100° (2x3 min), incubées dans des bains de toluène (2x2 min) et les lamelles ont été scellées sur les lames à l'Eukitt®.

Solution	Composition
Hématoxyline de Harris (modifiée)	5 g d'hématoxyline (Ugine-Kuhlmann) ont été dissous dans 50 ml
	d'éthylène glycol (ThermoScientific) $(0,1\% \text{ m/V})$ sur une plaque chaude
	agitée et ont été mélangés à 100 mg d'aluminium potassium sulfate
	(Normapur) dissous dans 950 ml d'eau ultrapure chauffée (10,5% m/V).
	Le mélange a été porté à ébullition puis 500 mg d'iodate de potassium
	ont été ajoutés (0,05% m/V). Une fois la solution refroidie, 4 ml d'acide
	acétique ont été ajoutés (0,4% V/V).
	L'aluminium potassium sulfate est le mordant et l'iodate de potassium a
	servi d'oxydant.
Alcool acidifié	Acide chlorhydrique à 0,37% dans 70% d'éthanol
Eosine Y 0.1%	1 g d'éosine Y (Acros Organics) a été mélangé à 1000 ml d'eau
	ultrapure. 4 gouttes d'acide chlorhydrique à 37% ont été ajoutées pour
	acidifier la solution.

Tableau 12 : Préparations et compositions des solutions utilisées pour la coloration HE.

c. Comptages des follicules ovariens

Les structures ovariennes ont été observées au microscope optique (Olympus BX41), groupées et comptées selon la classification suivante, établie par Moffatt-Blue *et al.*, 2006 chez le hamster djungarien (figure 48) :

- Follicule pré-antral : l'ovocyte est entouré d'une à plusieurs couches de cellules granulaires, le follicule peut s'entourer de thèque et la cavité antrale n'est pas présente (follicules primordiaux, primaires et secondaires)
- Follicule antral : l'ovocyte est entouré de plusieurs couches de cellules granulaires (granulosa), la cavité antrale s'est creusée dans la granulosa et la thèque s'est organisée en deux couches (thèque interne/externe)
- **3.** Follicule atrétique : le follicule présente au moins 5 noyaux pycnotiques dans les cellules granulaires et/ou l'oocyte se dégrade
- **4.** Follicule atrétique avancé : l'oocyte en dégradation est entouré de paquets de cellules lutéales, eux-mêmes entourés d'une pseudo-thèque (diamètre de 210 à 430 μm)
- **5.** Follicule atrétique terminal : l'oocyte en dégradation est entouré de paquets de cellules lutéales, la pseudo-thèque s'est résorbée (diamètre de 150-270 μm)
- 6. Corpus luteum : le follicule dégénère et les cellules granulaires et thécales sont devenues des cellules lutéales, la structure est traversée par de nombreux vaisseaux sanguins

Pour éviter les doubles comptages, seuls les follicules présentant un ovocyte visible ont été pris en compte. Lors du comptage des corpora lutea qui ne contiennent pas d'ovocyte, nous avons pris soin de ne pas compter plusieurs fois la même structure si on la retrouvait sur les coupes adjacentes.



Figure 49 : Stades de maturation et d'atrésie des follicules ovariens. (A) Follicule primordial, (B) follicule primaire, (C) follicule secondaire, (D) follicule antral, (E) corpus luteum, (F) follicule atrétique avancé, (G) follicule atrétique terminal. Barre d'échelle (trait blanc) = 50 µm.

9. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM et ont été analysées avec GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) ou CalR (version 1.3, Mina *et al.*, 2018) concernant les données obtenues dans les cages métaboliques.

La normalité des données a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk avant chaque analyse, avant de décider de l'utilisation d'un test statistique paramétrique ou non.

Les proportions ont été comparées entre les groupes expérimentaux par des tests du χ^2 .

Les valeurs répétées dans le temps ont été analysées entre les groupes expérimentaux par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) suivie de tests *post hoc* de Sidak. Des analyses à effetmixte ont été utilisées à la place de l'ANOVA à deux facteurs lorsque des valeurs étaient manquantes.

Les comparaisons entre les groupes expérimentaux (véhicule *vs* BPA, ou véhicule en PC *vs* véhicule en PL) ont été analysées par des tests-t ou des tests de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'analyse statistique des données obtenues dans les cages métaboliques a été réalisée avec CalR (version 1.3, Mina *et al.*, 2018). Les paramètres métaboliques indépendants du poids corporel (quotient respiratoire, activité ambulatoire) ont été analysés par ANOVA à un facteur. Les valeurs moyennées par période (diurne, nocturne) des paramètres métaboliques dépendants du poids corporel (prise alimentaire, dépense énergétique, consommation en O₂, production de CO₂) ont été corrélées au poids corporel, utilisé comme covariable dans un modèle linéaire généralisé. Si le modèle ne montrait pas d'interaction entre le groupe et le poids corporel, alors le paramètre métabolique était comparé entre les groupes expérimentaux par analyse de la covariance (ANCOVA) - une condition essentielle de l'ANCOVA étant qu'il n'y ait pas d'interaction significative entre le groupe et le poids corporel. Si le modèle montrait un effet d'interaction significatif entre le groupe et le poids corporel, alors le paramètre métaboliques corporel. Si le modèle montrait un effet d'interaction significatif entre le groupe et le poids corporel, alors le paramètre métabolique était comparé entre is pentes non parallèles) (Mina *et al.*, 2018).

Pour toutes les analyses statistiques, le seuil de signification a été fixé à une valeur-p < 0.05.
Résultats

1. Vérification de l'exposition au BPA chez les mères

Le BPA-glucuronide a été mesuré dans le plasma des mères exposées au véhicule (éthanol 0,05%) ou à 5 μ g/kg/jour de BPA, quotidiennement, par voie orale, depuis l'accouplement jusqu'au 15^{ème} jour lactationnel. Sur les 10 mères exposées au BPA, des concentrations notables de BPA-glucuronide ont été retrouvées dans les plasmas de 9 d'entre elles, tandis qu'aucune trace du métabolite n'a été détectée chez les mères exposées au véhicule (figure 49).

2. Effet de l'exposition au BPA sur la fertilité

Les femelles exposées au BPA ont tendu à être plus gestantes que les femelles exposées au véhicule puisque 44,4% des femelles accouplées et exposées au BPA ont mené une gestation à terme, contre seulement 27,3% des femelles exposées au véhicule (tableau 13). Cependant, l'observation de cette différence n'a pas atteint le seuil de significativité statistique. En outre, elles ont donné naissance à 1,8 fois plus de petits et ont en perdu significativement moins que les femelles exposées au véhicule. L'exposition au BPA n'a pas affecté la taille et le sexe-*ratio* des portées.

3. Effet de l'exposition au BPA sur le comportement maternel

L'observation du comportement maternel par des sessions d'échantillonnage par balayage aux jours lactationnels 2, 4, 7, et 14 a mis en évidence que les mères exposées au BPA présentaient une fréquence de comportements de soin dirigés vers les petits significativement réduite par rapport aux femelles exposées au véhicule, au jour lactationnel 14 (figure 50). Par conséquent, elles présentaient ce même jour une fréquence significativement plus importante de comportements non dirigés vers les petits. Les comportements maternels étaient comparables entre groupes aux autres jours évalués et majoritairement dirigés vers les petits.



Figure 50 : Concentrations plasmatiques en BPA-glucuronide des mères exposées au véhicule ou à 5 μ g/kg/jour de BPA par une administration orale quotidienne pendant l'accouplement, la gestation et la lactation.

Le BPA-glucuronide a été détecté par LC-MS/MS. Les données sont présentées en valeurs individuelles avec les moyennes \pm SEM (n = 10 hamsters/groupe). BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

	Véhicule	BPA	
	(n=33 accouplements)	(n=27 accouplements)	
Gestation menée à terme (%)	27,3	44,4 (p = 0 , 076)	
Mortalité post-natale (%)	26,2	3,3 (<i>p</i> = 0,0007)	
Nombre de petits vivants au sevrage	31	57	
Nombre de petits vivants par portée	$4,4 \pm 0,6$	4,8 ± 0,5 (p = 0,692)	
Sexe-ratio	$0,5 \pm 0,06$	0,55 ± 0,28 (<i>p</i> = 0,574)	

Tableau 13 : Effet de l'exposition au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle sur les naissances, la mortalité post-natale, la taille et le sexe-ratio des portées de hamsters djungariens.

Les proportions de gestations menées à terme et de mortalité post-natale ont été comparées entre groupes par des tests du χ^2 et les tailles et sexe-ratio des portées, exprimées en moyenne \pm SEM, ont été comparées entre groupes par des tests-t. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 51 : Effets de l'exposition au BPA sur les comportements de soin des petits (allaitement, toilettage, contact, construction du nid) et non dirigés vers les petits (auto-toilettage, prise alimentaire et hydrique, absence de contact envers les petits) aux jours lactationnels 2, 4, 7 et 14. Les valeurs individuelles sont présentées ainsi que les moyennes \pm SEM (n = 8-12 hamsters/groupe). L'évolution des comportements maternels au cours des jours lactationnels a été comparée entre les groupes par une analyse à effet-mixte et des tests *post hoc* de comparaisons multiples de Sidak (*, p<0,05). BPA = bisphénol A, JL = jours lactationnels, SEM = écart standard à la moyenne.

	Véhicule	BPA
Âge à l'ouverture vaginale (jours)	52 ± 6,2	50 ± 3,2 (p = 0,772)
Âge à la séparation balano-préputiale		
et volume testiculaire >100 mm ³	$36,9 \pm 1,6$	34,9 ± 1,1 (<i>p</i> = 0,304)
(jours)		

Tableau 14 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur l'apparition de la puberté des femelles (âge à l'ouverture vaginale) et des mâles (âge à la séparation balano-préputiale et au volume testiculaire >100mm³) hamsters djungariens.

Les données sont présentées en moyenne \pm SEM (n = 7-12 hamsters/groupe) et ont été comparées entre groupes par des tests-t. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

À la suite des accouplements et des naissances générées, nous avons suivi des paramètres somatiques et endocriniens au cours du cycle de vie des petits hamsters mâles et femelles. Cela nous a permis d'évaluer l'impact de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur la croissance et la puberté des petits, leur métabolisme énergétique et leur système reproducteur à l'âge adulte, puis leur capacité à adapter leur physiologie à un changement photopériodique.

Pour simplifier la lecture des résultats et des graphiques suivants obtenus chez les petits, la mention de l'exposition au BPA ou au véhicule réfère à l'exposition au BPA ou au véhicule par la mère pendant la gestation et la lactation.

4. <u>Évaluation des effets somato-endocriniens à long-terme d'une exposition maternelle au</u> <u>BPA chez le hamster djungarien femelle</u>

a. Puberté et croissance

L'apparition de la puberté a été évaluée par l'observation hebdomadaire de l'ouverture vaginale pendant 6 semaines après le sevrage. Les femelles exposées au véhicule et au BPA sont devenues pubères, en moyenne, entre le 50 et 52^{ème} jour post-natal, sans impact significatif de l'exposition maternelle au BPA (tableau 14).

Le poids corporel et la prise alimentaire ont été mesurés chaque semaine, depuis le sevrage jusqu'à l'âge de 5 mois. Durant cette période, les femelles exposées au véhicule ont gagné 51% (\pm 4%) de leur poids corporel tandis que les femelles exposées au BPA en ont gagné 74% (\pm 6%) (figure 51A). Cette différence s'est traduite par une augmentation significative du gain de poids corporel des femelles exposées au BPA comparativement aux femelles exposées au véhicule, et ce, malgré des poids corporels sensiblement identiques au moment du sevrage (figure 51B). De façon surprenante, les femelles exposées au BPA présentant un fort gain de poids corporel ont montré, pendant cette même période post-sevrage, une prise alimentaire cumulée significativement réduite par rapport à celle des femelles exposées au véhicule (figure 51C & 51D). Ces résultats suggèrent que la plus forte croissance des femelles exposées au BPA n'a visiblement pas été causée par une plus forte prise alimentaire de ces petits.

b. Métabolisme énergétique et système reproducteur à l'âge adulte

À l'âge adulte, une partie des femelles a été testée dans des cages métaboliques mesurant en temps réel les échanges gazeux, l'activité ambulatoire et la prise alimentaire des animaux pendant 3 jours consécutifs. Les mesures d'échange gazeux ont permis de calculer la dépense énergétique et le quotient respiratoire des hamsters. Nous avons observé que les femelles exposées au BPA présentaient une production de CO_2 réduite en phase nocturne comparativement aux femelles exposées au véhicule, ainsi qu'une tendance (non-significative) à une activité ambulatoire diminuée en phase nocturne (tableau 15).

Dans l'analyse statistique, le poids corporel a été inclus en tant que co-variable pour les paramètres métaboliques dépendants de la masse corporelle, telles que la prise alimentaire, la dépense énergétique, la consommation en O_2 et la production de CO_2 . Cette analyse a mis en évidence des effets d'interaction entre le poids corporel et l'exposition au BPA pour les paramètres de dépense énergétique, la consommation en O_2 et la production de CO_2 en période nocturne (tableau 15, figure 52). Ces résultats suggèrent que, pour un même poids corporel, les femelles exposées au BPA dépensent moins d'énergie, consomment moins d' O_2 et produisent moins de CO_2 en période nocturne. Les valeurs des quotients respiratoires évoquent que les hamsters utilisent l'oxydation des lipides pour dépenser leur énergie en phase diurne et nocturne, de manière similaire entre les femelles des deux groupes expérimentaux. L'exposition au BPA n'a pas impacté les autres paramètres métaboliques analysés en phase diurne (tableau 15).

Les cerveaux, organes reproducteurs et plasma de ces femelles ont ensuite été prélevés pour évaluer l'effet de l'exposition maternelle au BPA sur le système reproducteur et les acteurs neuroendocriniens régulant la reproduction et le métabolisme énergétique des hamsters.

La fonctionnalité ovarienne a été étudiée en comptant les follicules ovariens en croissance (follicules pré-antraux, antraux) et atrétiques (début d'atrésie, atrésie avancée et terminale). Nos comptages ont mis en évidence une diminution significative du nombre de follicules atrétiques, notamment en début d'atrésie, chez les femelles exposées au BPA, par rapport aux femelles exposées au véhicule (figure 53). Le pool de follicules total, en croissance et/ou atrésie, a été comparable entre groupes (données non illustrées). L'exposition au BPA n'a pas impacté le nombre de corpora lutea par ovaire des hamsters. Les concentrations circulantes en œstradiol ainsi que le poids relatif des ovaires et utérus étaient également similaires entre les deux groupes de femelles (figure 54).

L'analyse des gènes hypothalamiques régulant la reproduction et le métabolisme énergétique des hamsters est encore en cours.

c. Intégration du changement photopériodique à l'âge adulte

Enfin, on a évalué l'impact de l'exposition maternelle au BPA sur les capacités d'adaptation physiologique des femelles hamsters lors d'un changement photopériodique à l'âge adulte. Pour cela, une partie des femelles exposées au BPA ou au véhicule, adaptées depuis leur naissance à la PL ont été transférées en PC pendant 12 semaines.

À l'issue des 12 semaines de PC, les femelles exposées au BPA ont perdu 18% (\pm 2%) de leur poids corporel, contre 12% (\pm 2%) pour celles exposées au véhicule. Cette différence s'est traduit en une perte de poids corporel brut significativement plus prononcée pour les femelles exposées au BPA comparativement aux femelles exposées au véhicule (figure 55), et ce, malgré des poids corporels sensiblement identiques entre les groupes avant le transfert en PC (véhicule = 30.9 ± 1.8 g ; BPA = 30.4 ± 1.3 g, données non illustrées). Les femelles exposées au BPA ont également présenté une prise alimentaire significativement plus faible sur la période des 6 premières semaines de PC (figure 55), cette différence entre les groupes s'est résorbée sur les 6 dernières semaines de PC (données non illustrées). La glycémie des femelles exposées au BPA était plus faible que celles exposées au véhicule après 12 semaines de PC.

La quiescence reproductive a été suivie en observant chaque semaine la fermeture progressive de l'orifice vaginal. Les femelles exposées au BPA étaient significativement plus nombreuses à présenter une fermeture vaginale à la 7^{ème} semaine de PC (62,5% *vs* 12,5% des femelles exposées au véhicule, figure 56). Sur l'ensemble des femelles présentant ce phénotype de quiescence reproductive, nous avons observé que la fermeture vaginale tendait à survenir 3 semaines plus tôt pour les femelles exposées au BPA comparativement aux femelles exposées au véhicule. Cependant, cette observation était à la limite du seuil de significativité, probablement parce-que l'analyse a été réalisée uniquement sur les 62,5% des femelles présentant une fermeture vaginale complète. Après 12 semaines de PC, autant de femelles exposées au BPA qu'au véhicule présentaient un phénotype reproducteur quiescent. De plus, la régression des utérus et des ovaires ainsi que les concentrations plasmatiques d'œstradiol étaient comparables entre les groupes à l'issue des 12 semaines de PC.

L'apparition du pelage hivernal, définie par un score de pelage >2, est survenue, en moyenne, à la 8^{ème} semaine de PC pour toutes les femelles, sans impact significatif de l'exposition au BPA. Cependant, à la 12^{eme} semaine de PC les femelles exposées au BPA présentaient un pelage significativement moins foncé que les femelles exposées au véhicule (figure 57).

L'analyse des gènes hypothalamiques intégrant le message photopériodique et régulant la reproduction et le métabolisme énergétique des hamsters est encore en cours.

5. Évaluation des effets somato-endocriniens à long-terme d'une exposition maternelle au BPA chez le hamster djungarien mâle

a. Croissance et puberté

Au cours des 18 semaines suivants le sevrage, les mâles exposés au véhicule ont gagné 67% $(\pm 5\%)$ de leur poids corporel tandis que les mâles exposés au BPA en ont gagné 105% $(\pm 12\%)$ (figure 51). Cette différence s'est traduit en un gain de poids corporel brut significativement supérieur pour les mâles exposés au BPA par rapport aux mâles exposés au véhicule, et ce, malgré des poids corporels similaires au sevrage (figure 51 A, B et C).

Les mâles exposés au BPA ont gagné plus de poids corporel lors de la croissance mais ont présenté une prise alimentaire cumulée comparable à celle des mâles exposés au véhicule (figure 51 D).

De la même façon que les femelles, ces résultats suggèrent que la croissance plus importante des mâles exposés au BPA n'a visiblement pas été causée par une prise alimentaire plus importante.

L'apparition de la puberté des mâles a été évaluée par l'observation hebdomadaire de la SBP et l'EVT pendant 6 semaines après le sevrage. Les mâles exposés au véhicule et au BPA sont devenus pubères, en moyenne, entre le 35^{ème} et 37^{ème} jour post-natal, sans impact significatif de l'exposition maternelle au BPA (tableau 14).

b. Système reproducteur à l'âge adulte

A l'âge adulte, les mâles ont présenté des poids relatifs testiculaires et des concentrations circulantes en testostérone comparables entre les groupes (figure 54).

c. Intégration du changement de photopériode à l'âge adulte

Une partie des mâles a ensuite été transférée en PC pendant 12 semaines. Nous n'avons observé aucun impact significatif de l'exposition maternelle au BPA sur l'intégration physiologique de la PC.

Les mâles issus des deux groupes expérimentaux ont tous perdu, en moyenne, entre 13 et 17% de leur poids corporel (figure 55). La perte de poids corporel brut a été comparée entre mâles transférés en PC et mâles maintenus en PL pendant 12 semaines, au même âge, et était significativement plus prononcée pour les mâles transférés en PC, confirmant l'impact de la PC sur la perte de poids corporel. L'exposition au BPA n'a altéré ni la perte de poids corporel brut, ni la prise alimentaire des mâles.

La totalité des mâles a progressivement présenté un phénotype de quiescence reproductive (diminution du volume testiculaire <100 mm³). La proportion de mâles en quiescence reproductive a été similaire à chaque semaine du protocole entre les groupes expérimentaux, et la résorption de la séparation balano-préputiale est survenue, en moyenne, entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine de PC pour tous les animaux (figure 56). À la 12^{ème} semaine de PC, tous les mâles présentaient une régression importante des testicules et des vésicules séminales, ainsi que des concentrations plasmatiques en testostérone détectables mais très faibles (tableau 16).

Enfin le pelage hivernal a été acquis entre la 6^{eme} et 7^{eme} semaine pour l'ensemble des mâles qui présentaient tous un stade avancé dans le blanchiment de leur pelage, sans impact significatif de l'exposition au BPA (figure 57).



Figure 52 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur le poids corporel et la prise alimentaire des petits après le sevrage.

(A) Croissance en poids corporel des petits, mâles et femelles, du sevrage (4^{ème} semaine) à la 22^{ème} semaine de vie. (B) Poids corporel des petits, mâles et femelles, au sevrage. (C) Gain de poids corporel des petits, mâles et femelles, entre le sevrage et la 22^{ème} semaine de vie. (D) Prise alimentaire des petits, mâles et femelles, cumulée sur les 18 semaines post-sevrage. Les valeurs individuelles sont présentées avec les moyennes \pm SEM (n = 14-21 hamsters/groupe). Pour chaque sexe, les données ont été comparées entre groupes (véhicule vs BPA) par des tests-t (*, p <0,05 ; **, p <0,01). BPA = bisphénol A, Δ = différence, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 53 : Représentation des données et de l'analyse de la dépense énergétique des hamsters femelles exposées maternellement au BPA par calorimétrie indirecte. La dépense énergétique a été évaluée pendant 68 h en mesurant les échanges gazeux des hamsters en temps réel dans des cages métaboliques.

(A) La dépense énergétique est moyennée par heure (\pm SEM, n = 8 hamsters/groupe) pour chaque groupe de femelles (BPA, véhicule) sur une période de 68 h (les rectangles gris représentent les phases nocturnes). (B) Un modèle linéaire généralisé corrèle les données individuelles de dépense énergétique moyennée (ici, pendant la période nocturne) aux poids corporels individuels afin de mettre en évidence les effets d'interaction entre groupe et poids corporel. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.

	Période diurne		Période nocturne			
	Véhicule	BPA	Effet	Véhicule	BPA (n = 8)	Effet
	(n = 8)	(n = 8)		(n = 8)		
Prise alimentaire (kcal/période)	5,1 ± 0,49	6,3 ± 0,50	-	4,6 ± 0,73	4,4 ± 0,58	poids *
Dépense énergétique (kcal/période)	5,3 ± 0,18	5,6 ± 0,25	poids **	4,2 ± 0,25	4,0 ± 0,22	poids ** poids x groupe *
Consommation en O2 (ml/h)	83 ± 2,9	87 ± 3,7	poids **	115 ± 6,8	108 ± 5,9	poids ** poids x groupe *
Production de CO2 (ml/h)	64 ± 2,4	68 ± 3,6	poids **	86 ± 5,5	82 ± 4,5	poids ** groupe * poids x groupe *
Quotient respiratoire	0,77 ± 0,017	0,78 ± 0,010	-	0,75 ± 0,012	0,76 ± 0,010	-
Activité ambulatoire (déplacement/h)	20 ± 4,6	16 ± 4,4	-	287 ± 79	133 ± 22	- (p=0.08)

Tableau 15 : Effet de l'exposition maternelle au BPA sur des paramètres métaboliques mesurés par calorimétrie indirecte, l'activité ambulatoire et la prise alimentaire des hamsters djungariens femelles, en fonction des périodes de la journée.

Les mesures ont été relevées en testant des femelles exposées au BPA ou au véhicule en cages métaboliques pendant 68 h. Les données ont été moyennées par période de la journée et sont indiquées sous forme de moyenne \pm SEM. Les paramètres métaboliques dépendants du poids corporel (prise alimentaire, dépense énergétique, consommation en O₂, production de CO₂) ont été analysés par un modèle linéaire généralisé prenant en compte le poids corporel comme co-variable (*, p <0,05 ; **, p <0,01). Les autres paramètres ont été analysés par ANOVA à un facteur. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 54 : Impact de l'exposition maternelle au BPA sur le nombre moyen de follicules préantraux, antraux, atrétiques et les corpora lutea des hamsters djungariens femelles à l'âge adulte. Les follicules (A) et les corpora lutea (B) ont été comptés sur des coupes d'ovaires colorées à l'hématoxyline/éosine. Les valeurs individuelles dont données avec les moyennes \pm SEM (n = 5-8 hamsters/groupe). Les données ont été comparées entre les groupes par des tests-t (**, p <0,01). BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 55 : Paramètres somatiques et endocriniens du système reproducteur de hamsters djungariens adultes exposés au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle.

Les valeurs individuelles des poids relatif des utérus et des ovaires (A), des testicules (C), et des concentrations plasmatiques en œstradiol (B) et en testostérone (D) dosées par ELISA et LC-MS/MS sont présentées avec les moyennes \pm SEM (n = 8-12 hamsters/groupe). Les données ont été comparées entre les groupes par des tests-t. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 56 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur le poids corporel, la prise alimentaire et la glycémie de hamsters djungariens mâles et femelles transférés en photopériode courte pendant 12 semaines.

Pourcentage de poids corporel et prise alimentaire au cours des 12 semaines de PC des hamsters djungariens femelles (**A**) et mâles (**B**). (**C**) Perte de poids corporel entre la $12^{\text{ème}}$ semaine de PC et le début de la PC. (**D**) Prise alimentaire cumulée au cours des 6 premières semaines de PC. Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n = 7-9 hamsters/groupe). Pour chaque sexe, les groupes ont été comparés par des tests-t (*, p <0,05). Veh = véhicule, BPA = bisphénol A, PC = photopériode courte (8 h de lumière/16 h d'obscurité), Δ = différence, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 57 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur la quiescence reproductive de hamsters djungariens mâles et femelles induite par un transfert de 12 semaines en photopériode courte.

(A) Pourcentage de femelles présentant une fermeture de l'orifice vaginale et de mâles présentant un volume testiculaire estimé (EVT) <100 mm³ au cours des 12 semaines de PC. Temps de survenue de la fermeture vaginale (B) et de la résorption de la séparation balano-préputiale (SBP) (C) en PC. Les données sont présentées en proportions et ont été comparées entre groupes par des tests du χ^2 (*, p<0,05) (A) ou en valeurs individuelles avec les moyennes \pm SEM (n = 5-9 hamsters/groupe) et comparées entre groupes par des tests-t ou des tests de Wilcoxon-Mann-Whitney (B, C). Veh = véhicule, BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne, PC = photopériode courte (8 h de lumière/16 h d'obscurité).

	Femelles		Mâles	
	Véhicule (n=7)	BPA (n=8)	Véhicule (n=7)	BPA (n=9)
Poids relatif des utérus et ovaires (♀) / testicules (♂) (mg/g de poids corporel)	1,19 ± 0,08	1,26 ± 0,11	$1,51 \pm 0,05$	$1,66 \pm 0,05$
Poids relatif des vésicules séminales (mg/g de poids corporel)			2,51 ± 1,22	1,48 ± 0,22
Estradiol (♀) (pg/mL) / Testostérone (♂) (ng/mL)	68,8 ± 13,9	65,5 ± 6	$0,\!47 \pm 0,\!04$	0,43 ± 0,03

Tableau 16 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur des paramètres somatiques et endocrines du système reproducteur de hamsters djungariens mâles et femelles transférés en photopériode courte pendant 12 semaines.

Les moyennes \pm SEM des poids relatifs des utérus et des ovaires, testicules, vésicules séminales et des concentrations plasmatiques en œstradiol et en testostérone dosées par ELISA et LC-MS/MS sont présentées avec les moyennes \pm SEM. Les données ont été comparées entre les groupes par des tests-t. BPA = bisphénol A, SEM = écart standard à la moyenne.



Figure 58 : Effet de l'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation sur les variations de pelage de hamsters djungariens mâles et femelles transférés en photopériode courte pendant 12 semaines.

Les variations de pelage des hamsters transférés en PC ont été scorées d'après les index de Figala. (A) Temps de la survenue du pelage hivernal (stade >2) au cours de 12 semaines de PC. (**B**) Stade du pelage des hamsters à la $12^{\text{ème}}$ semaine de PC. Les valeurs individuelles sont présentées avec les moyennes ± SEM (n = 7-9 hamsters/groupe). Pour chaque sexe, les groupes ont été comparés par des tests-t (*, p <0,05). BPA = bisphénol A, PC = photopériode courte (8 h de lumière, 16 h d'obscurité), SEM = écart standard à la moyenne.

Discussion

Cette étude visait trois objectifs principaux. Le premier a été de déterminer si une exposition à une faible dose de BPA (5 μ g/kg/jour) pendant la gestation et la lactation de notre modèle de rongeur saisonnier, le hamster djungarien, pouvait altérer la fertilité et le comportement maternel. Le second a été d'évaluer les impacts de cette exposition sur l'apparition de la puberté, la croissance des petits, et sur l'état du système reproducteur et énergétique à l'âge adulte. Enfin, le dernier objectif a été de déterminer si la capacité de la descendance à intégrer le message photopériodique et à générer des réponses physiologiques adaptées était impactée par l'exposition au BPA en début de vie.

1. <u>L'exposition périnatale au BPA perturbe la fertilité et le comportement maternel des</u> hamsters femelles

De prime abord, un plus grand nombre de succès gestationnel des mères exposées au BPA est un résultat inattendu en regard des données de la littérature qui rapportent généralement que le BPA induit une hypofertilité chez les rongeurs (Ziv-Gal et al., 2015 ; Cabaton et al., 2011 pour exemples). Le taux de fertilité des hamsters contrôles apparaît relativement faible, mais ce résultat a été répliqué une deuxième fois (avec de nouveaux couples reproducteurs) car la génération d'un nombre suffisant de petits exposés ou non au BPA a nécessité le lancement de deux mises en reproduction. À chaque mise en reproduction, les couples dont les femelles étaient exposées au BPA obtenaient un meilleur succès reproducteur. Des études évaluant l'exposition à des doses environnementales de BPA sur des mollusques rapportent également une augmentation de la fertilité (Jobling et al., 2003 ; Duft et al., 2003), toutefois, les mécanismes de régulation de la reproduction sont peu comparables entre invertébrés et rongeurs. Chez les rats et les souris, le BPA est à l'origine d'anomalies de la folliculogénèse et du tractus de l'appareil reproducteur (Rodriguez-Lopez et al., 2019; Santamaria et al., 2016). De ce fait, dans notre expérience, il est assez peu probable que le BPA ait favorisé l'ovulation pendant la période d'accouplement ou l'implantation de l'embryon, bien que cette hypothèse ne soit pas à exclure en regard de l'inexistence de données sur les effets du BPA sur le système reproducteur du hamster djungarien. Une autre hypothèse serait que l'exposition au BPA ait favorisé les comportements sexuels, une observation non évaluée dans notre étude mais déjà reportée par Farabollini et coll. en 2002 chez des rats femelles exposées à 40 µg/kg/jour de BPA en période périnatale.

La diminution significative de la mortalité post-natale des petits nés de mères exposées au BPA nécessite également d'être investiguée. Chez la souris, la mortalité post-natale précoce a été associée à l'âge avancé des mères, la présence d'une portée issue d'un accouplement précédent et la taille trop petite ou trop grande de la portée (Morello *et al.*, 2020). Néanmoins, aucune de ces conditions n'a été présente au cours de notre étude et l'exposition au BPA n'a pas impacté la taille des portées.

Notre étude, première à décrire les effets de l'exposition au BPA sur le comportement maternel du hamster djungarien, montre que les mères exposées au BPA présentent une altération des comportements de soin envers les petits au 14^{ème} jour lactationnel. Ce résultat est cohérent avec les effets du BPA reportés chez le rat (Della Seta et al., 2005) et la souris (Palanza et al., 2002, Johnson et al., 2015). L'établissement et la manifestation du comportement maternel sont régulés par un circuit complexe faisant intervenir de multiples structures cérébrales, dans lesquelles, les connexions neurales, les nombres et l'activité de neurones se réorganisent lors de la parturition sous l'influence de changements hormonaux incluant les œstrogènes, la progestérone, l'ocytocine et la prolactine (Bridges, 2015). La perturbation de l'action de l'une ou plusieurs de ces hormones pendant la gestation et/ou la parturition est donc susceptible d'empêcher la mère de se comporter de manière appropriée envers les petits et de leur apporter les soins nécessaires (Keller et al., 2019 pour revue). Les mécanismes par lesquels les PE, et notamment le BPA, perturbent les circuits du comportement maternel sont assez peu connus. Des altérations de l'expression des ER ont été rapportées dans l'aire médiane préoptique (Aloisi et al., 2001) et l'ARC (Catanase et Vandenberg, 2017) de souris mères exposées. Il serait intéressant d'investiguer l'action du BPA sur le cerveau maternel des hamsters djungariens afin de comprendre si les effets observés plus tard chez les petits sont imputables à un effet indirect via l'altération du comportement maternel et/ou un effet direct via le placenta, le sang et le lait maternel. En effet, des altérations du comportement maternel peuvent induire des modifications épigénétiques dans l'hypothalamus des petits qui peuvent être transmises aux générations suivantes (Champagne et al., 2006; Pena et al., 2013, Lopez-Rodriguez et al., 2021). Dans notre étude, une expérience supplémentaire de cross-fostering (adoption croisée) entre petits exposés au BPA-mères contrôles et petits exposés au véhicule-mère BPA permettrait de déterminer si les effets observés à long terme chez les petits hamsters sont attribuables à un effet direct ou indirect du BPA.

2. <u>L'exposition au BPA pendant la gestation et la lactation induit des effets obésogènes chez</u> <u>la descendance</u>

Après le sevrage, les hamsters mâles et les femelles exposés au BPA pendant la gestation et la lactation ont présenté une prise de poids corporel supérieure aux animaux contrôles. Les résultats d'études précédentes réalisées chez la souris rapportent des effets métaboliques de l'exposition périnatale au BPA contradictoires. En effet, des études ont montré que l'exposition périnatale au BPA entraîne une prise de poids augmentée chez des souris mâles et femelles (Nikaido *et al.*, 2004 ; Rubin et Soto, 2009), tandis que d'autres études ont rapporté une augmentation du poids uniquement chez la femelle (Miyawaki *et al.*, 2007) ou uniquement chez le mâle (Le Corre *et al.*, 2013). Il serait intéressant d'analyser et de comparer la composition corporelle des hamsters exposés ou non au BPA afin de préciser si le gain de poids corporel est corrélé à une augmentation de la masse grasse, indiquant que le

BPA a eu un effet de type « obésogène », ou à une augmentation de la masse maigre, indiquant que le BPA a eu un effet de type « facteur de croissance ». Quelques études rapportent plutôt un effet « facteur de croissance » du BPA chez des souris et des rats exposés pendant la période périnatale (Miyawaki *et al.*, 2007 ; Somm *et al.*, 2009 ; Wei *et al.*, 2011 ; Le Corre *et al.*, 2013).

L'augmentation du poids corporel des hamsters n'est pas liée à une prise alimentaire accrue puisque celle-ci est significativement réduite par rapport aux contrôles pour les femelles et similaire aux contrôles pour les mâles. Ces résultats suggèrent que les petits exposés au BPA pendant la période périnatale présenterait un déficit de leur dépense énergétique. L'étude de calorimétrie indirecte réalisée chez les femelles à l'âge adulte a confirmé cette hypothèse puisque les femelles exposées au BPA avaient une production de CO₂ réduite en phase nocturne en comparaison des femelles contrôles. Par ailleurs, l'analyse statistique n'a pas révélé un effet direct de l'exposition maternelle au BPA sur leur dépense énergétique, mais a démontré un effet interactionnel de l'exposition au BPA avec le poids corporel, suggérant que pour un fort poids corporel, la dépense énergétique est réduite pour les femelles exposées au BPA par rapport à celle des femelles contrôles. Une autre étude a rapporté que des souris femelles exposées périnatalement au BPA présentent une dépense énergétique en phase nocturne comparable aux femelles contrôles mais des quotients respiratoires augmentés en phase nocturne (Johnson et al., 2015). Les auteurs proposent que l'exposition périnatale au BPA réduit l'utilisation des lipides pour fournir l'ATP ce qui promeut les dépôts de graisse. Chez les hamsters femelles, un tel effet du BPA n'a pas été observé sur les quotients respiratoires dont les valeurs suggéraient plutôt une utilisation majoritaire des protides en phase diurne et une tendance à l'utilisation des lipides en phase nocturne des animaux contrôles et exposés. Néanmoins, la réduction de la dépense énergétique observée chez les femelles exposées au BPA s'associe à une tendance à la réduction de l'activité ambulatoire, qui est un effet également retrouvé chez la souris exposée périnatalement au BPA dans l'étude de Johnson et coll. en 2015. Les hamsters mâles exposés au BPA ont également présenté une plus forte croissance qui n'a pas été non plus associée à une augmentation de la prise alimentaire. Pour des raisons techniques, l'étude de la dépense énergétique des hamsters djungariens mâles n'a pas pu être réalisée mais il serait intéressant de vérifier si les mâles exposés au BPA présentent aussi un déficit de la dépense énergétique. En 2013, Le Corre et coll. ont observé que des souris mâles exposés périnatalement au BPA avaient une dépense énergétique réduite et présentaient une augmentation plus forte du poids corporel en période de croissance, comparativement aux contrôles, mais les conditions expérimentales étaient différentes de celles des hamsters puisque les souris à l'âge adulte étaient soumises à un régime hyperlipidique.

3. <u>Effet de l'exposition périnatale au BPA sur la puberté et le système reproducteur de la descendance</u>

L'exposition périnatale au BPA n'a pas modifié le moment de l'apparition de la puberté de la descendance mâle et femelle. Les observations de l'état d'ouverture vaginale et du volume testiculaire n'ont été réalisées qu'une fois par semaine, ce qui a pu limiter la résolution temporelle de l'évaluation de la puberté. Par ailleurs, pour les femelles, cette mesure aurait pu être consolidée par l'observation du premier estrus, un autre marqueur de puberté. Les données de la littérature sont relativement mitigées concernant les effets du BPA sur le moment de survenue de la puberté chez la souris et le rat car ils dépendant des doses administrées et de la période d'exposition. Une initiation normale de la puberté a été rapportée chez des rat femelles exposées au BPA durant la période périnatale (Murray *et al.*, 2007 ; Losa-Ward *et al.*, 2012). Mais d'autre études chez des rats femelles indiquent qu'une exposition pendant la gestation et/ou en période postnatale peut induire une avancée de la puberté (Honma *et al.*, 2002 ; Odum *et al.*, 2002) associée à des anomalies du tractus reproducteur (Adewale *et al.*, 2009) ou des altérations centrales (Losa-Ward *et al.*, 2012). Néanmoins, les effets du BPA sur la puberté des rongeurs mâles restent très peu documentés, même si une étude a observé un retard de la puberté chez des rats mâles exposés périnatalement au BPA (Oliveira *et al.*, 2017).

Même si l'exposition périnatale au BPA n'a pas impacté le poids des organes reproducteurs et les concentrations en stéroïdes sexuels des femelles et des mâles, il semble important d'évaluer par des approches histologiques la fonctionnalité des gonades. Chez les hamsters femelles adultes, exposées ou non au BPA pendant la période périnatale, des paramètres de folliculogenèse ont été analysés afin de détecter de potentiels effets sur la fonctionnalité ovarienne. Au cours de chaque cycle menstruel/oestrien, quelques follicules antraux subissent une maturation jusqu'au stade préovulatoire en réponse à la stimulation par la FSH, tandis que les autres follicules antraux dégénèrent dans un processus appelé atrésie. En réponse au pic préovulatoire de LH, les follicules préovulatoires libèrent les ovocytes matures en vue de la fécondation. Après l'ovulation, les cellules folliculaires restantes (cellules de la granulosa et de la thèque) se différencient en cellules lutéales, ce qui aboutit à la formation du corps jaune. Le comptage des follicules ovariens a mis en évidence une diminution significative du nombre de follicules atrétiques chez les femelles exposées maternellement au BPA comparé aux femelles exposées au véhicule. Une étude chez l'agnelle a également rapporté une diminution de l'atrésie folliculaire suite à une exposition postnatale précoce au BPA (Rivera et al., 2015). Cependant, d'autres études rapportent un effet opposé de l'exposition néonatale ou à l'âge adulte au BPA qui induit plutôt une atrésie folliculaire chez le rat et la souris (Rodriguez-Lopez et al., 2019; Tang et al., 2020). L'interprétation biologique de l'effet périnatal du BPA sur l'atrésie folliculaire est difficile car elle n'est pas associée à un pool plus élevé de follicules sains. Les données chez les hamsters femelles restent néanmoins préliminaires (n = 5 ovaires pour le groupe contrôle) et seront complétées (en cours d'analyse). Si, à la suite à cette analyse, l'effet du BPA sur la diminution de l'atrésie des follicules

ovariens est confirmée, il sera intéressant d'évaluer si le BPA a interféré sur les concentrations plasmatiques ou ovariennes des gonadotrophines qui régulent les mécanismes atrétiques (Hughes et Gorospe, 1991; McGee *et al.*, 2000). Chez les hamsters mâles, une analyse histologique de la spermatogénèse sera réalisée ultérieurement pour évaluer la fonctionnalité testiculaire.

4. Les effets du BPA sur l'intégration photopériodique de la descendance dépendent du sexe

L'analyse de la réponse au transfert en PC de hamsters mâles et femelles adultes a montré que l'exposition maternelle au BPA altère significativement la cinétique des adaptations métaboliques et reproductives à la PC chez les femelles, mais pas chez les mâles. Chez les femelles, l'exposition maternelle au BPA induit une accélération de l'acquisition des phénotypes reproducteurs et métaboliques de la PC, puisque qu'elles entrent plus tôt en quiescence reproductive, perdent plus de poids corporel et réduisent davantage leur prise alimentaire et leur glycémie que les femelles contrôles. En revanche, les mâles exposés maternellement au BPA présentent une même dynamique d'adaptations physiologiques à la PC que les mâles contrôles.

L'exposition périnatale au BPA a, comme l'exposition chez l'adulte, altérée la vitesse d'intégration des paramètres physiologiques plutôt chez les femelles que chez les mâles. Cependant, les effets paraissent opposés selon la fenêtre d'exposition. En effet, chez les hamsters femelles, l'exposition périnatale a induit une accélération du phénotype métabolique (maigre) de PC, alors que chez les femelles exposées au BPA (500 μ g/kg/jour) à l'âge adulte, le transfert en PC a induit un retard de l'acquisition du phénotype de la PC. Ces observations renforcent la notion que l'action du BPA dépend non seulement du sexe mais aussi de la période d'exposition au cours du cycle de vie.

L'observation d'une exposition périnatale du BPA sur l'intégration photopériodique de l'adule suggère que cette action à distance de l'exposition au BPA implique des effets organisationnels et/ou épigénétiques. L'effet organisationnel du BPA résulte probablement d'une réorganisation des circuits neuroendocriniens impliqués dans l'intégration de la photopériode lors de la période développementale d'exposition. Cette hypothèse sera testée par une analyse des hypothalamus des femelles, exposées ou non au BPA pendant la période gestationnelle et lactationnelle, puis soit transférées en PC soit gardées en PL. La stratégie envisagée est une analyse non-ciblée par séquençage ARN de tout l'hypothalamus afin de mettre en évidence l'altération potentielle de l'ensemble du transcriptome hypothalamique par l'exposition périnatale au BPA.

Les effets dimorphiques dans l'intégration de la PC, chez des hamsters adultes exposés au BPA en début de vie, suggèrent que le BPA a potentiellement réorganisé les circuits neuroendocriniens de l'intégration photopériodique d'une manière différentielle en fonction du sexe. De récentes études proposent que l'exposition au BPA en début de vie aurait des effets sexuellement dimorphiques à long terme à cause de changements épigénétiques différents en fonction du sexe (McCabe *et al.*, 2017 pour revue).

5. Perspectives générales

L'effet de l'exposition périnatale au BPA sur l'intégration photopériodique n'a été évalué que lors d'une transition de PL à PC. Il serait pertinent d'évaluer l'effet périnatal du BPA sur une intégration photopériodique opposée, lors d'une transition de PC à PL, et même lors d'un enchaînement consécutif de transitions photopériodiques, afin de mieux mimer les cycles de variations photopériodiques environnementales.

Les résultats de cette étude soulèvent l'hypothèse d'effets transgénérationnels de l'exposition au BPA sur les capacités d'intégration photopériodique de la descendance d'espèces saisonnières. Il existe un phénomène de programmation maternelle photopériodique, médié par la transmission placentaire de la mélatonine maternelle, capable de moduler l'adaptation physiologique de la descendance en fonction de l'historique photopériodique des mères, de façon à ce que la descendance ait un développement adapté à la saison à venir, malgré un système mélatoninergique fœtale immature (Saenz-Miera *et al.*, 2017 ; van Dalum *et al.*, 2019). Dans ce contexte, il serait pertinent de réaliser une exposition au BPA lors d'un protocole de programmation maternelle photopériodique afin d'évaluer son impact sur la transmission maternelle de la signalisation mélatoninergique sur la *pars tuberalis* des petits, l'activation des effecteurs hypothalamiques en aval, et à terme la trajectoire développementale des petits.

Discussion générale

1. Forces, limites et difficultés de la modélisation de l'exposition aux PE

a. Voie d'exposition

Nous avons décidé d'utiliser la voie orale pour administrer le BPA car, du fait de sa présence dans les sols et les eaux, il est probable que cette voie d'exposition soit majoritaire chez les animaux sauvages et d'élevage, et elle est avérée pour l'humain. Ce mode d'exposition ne modélise pas les voies d'exposition respiratoire et transcutanée. Néanmoins, la voie d'exposition par l'inhalation est minime compte-tenu de la rapide dégradation atmosphérique du BPA et l'exposition par le contact transcutané nous a semblé peu importante à modéliser dans le contexte d'un modèle écotoxicologique terrestre.

Lors de l'expérience d'exposition au BPA à l'âge adulte, nous avons opté pour une administration orale par l'alimentation. Cette méthode a présenté l'avantage de modéliser au plus près une exposition naturelle, sans induire d'effet bolus ni de stress (induits par un gavage oral par exemple). En revanche, ce mode d'exposition réduit la fiabilité de la dose reçue entre animaux car il dépend du comportement alimentaire de chaque animal. Les valeurs des concentrations plasmatiques en BPAglucuronide ont néanmoins présenté une dispersion acceptable entre les animaux exposés à une même dose.

Pour l'expérience d'exposition maternelle au BPA, nous avons fait le choix d'administrer le BPA par l'ingestion quotidienne unique d'une gelée depuis la période de la pré-conception jusqu'à la fin de l'allaitement. Cette méthode a permis de mieux contrôler la dose de BPA administrée à chaque femelle même si les doses ont été ajustées en fonction des poids corporels moyens des groupes de femelles et non pas en fonction du poids corporel individuel. Néanmoins, 9 femelles sur 10 ont présenté des taux de BPA-glucuronide dans le plasma, avec une dispersion inter-individuelle faible. Il se peut que cette méthode ait modifié la biodisponibilité du BPA par rapport à la méthode d'administration par l'alimentation continue puisque, pour une même dose journalière (5 µg/kg/jour), les concentrations de BPA-glucuronide dans le plasma des mères exposées par la gelée (de l'ordre de 10 pmole/ml) étaient plus élevées que les concentrations de BPA-glucuronide das femelles adultes exposées en continu par l'alimentation (valeurs sous le seuil de détection). Ces différences peuvent aussi être causées par des différences de métabolisme liées à l'état gestationnel (Vom Saal *et al.*, 2014).

b. Fenêtre et durée d'exposition

Pour évaluer les variations de la sensibilité des effets et des mécanismes d'action du BPA en fonction du cycle biologique, il est généralement admis d'étudier chaque fenêtre d'exposition séparément.

Dans ce contexte, nos expériences ont permis d'évaluer l'effet de l'exposition au BPA pendant les périodes critiques de transitions photopériodiques chez l'adulte et en pré/début de vie. L'exposition au BPA de l'accouplement jusqu'à la fin de la lactation a permis de modéliser une exposition sur l'ensemble de la fenêtre prénatale à la période post-natale précoce considérées comme des périodes très vulnérables en général, et aux PE en particulier. Cependant, ce protocole ne permet pas de discerner avec précision à quelles étapes de ces périodes de pré/début de vie (accouplement, gestation, périodes périnatale et post-natale précoce) les effets du BPA sont survenus. Par ailleurs, les expositions restreintes aux quelques semaines de transition photopériodique chez les hamsters adultes ne modélisent pas l'exposition permanente à laquelle sont soumis les animaux dans l'environnement.

c. Modélisation de l'exposition d'un seul PE ... sur (au moins) 1000

Les objectifs de nos travaux étaient d'analyser l'effet du BPA car c'est un contaminant largement répandu dans l'environnement. Or l'environnement contient un millier d'autres PE qui, sous forme de mélange, peuvent avoir des effets différents que la simple addition des effets individuels (Kortenkamp, 2014). L'étude des mélanges des PE est indispensable pour mieux modéliser la contamination environnementale et comprendre les modes d'action complexes des PE.

Dans le cadre de l'évaluation de la perturbation endocrinienne des espèces saisonnières, il serait intéressant de créer des cocktails de PE basés sur des analyses de prélèvements de milieux environnementaux contaminés et tester leurs effets sur l'intégration des adaptations physiologiques aux changements photopériodiques de hamsters djungariens, dans des conditions contrôlées de laboratoire.

2. Quels impacts écologiques ?

a. Surfertilité

Dans un contexte environnemental préoccupant pour la biodiversité, où 27% des espèces sont menacées d'extinction (Brondizio *et al.*, 2019), l'augmentation de la fertilité de hamsters djungariens femelles induite par une exposition alimentaire au BPA au cours de la gestation peut être interprétée, au premier abord, comme un bénéfice considérable pour le succès reproducteur des individus.

Néanmoins, nos conditions expérimentales ont été limitées à la mère avec une modélisation très modérée des conditions environnementales du fait que l'exposition a été relativement aiguë car restreinte à la période gestationnelle et lactationnelle. Il est nécessaire d'évaluer également l'effet d'une exposition au BPA sur la fertilité des hamsters mâles. Il est possible que l'effet sur la fertilité des mâles soit différent étant donné que de nombreuses études chez le rongeur mâle et l'homme rapportent une dégradation de la qualité du sperme, une altération de la spermatogénèse et une réduction des comportements sexuels induites par l'exposition au BPA (Park *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2013 ; Picot *et al.*, 2014).

b. Altération des cinétiques d'intégration

L'exposition au BPA pendant la période périnatale ou pendant l'âge adulte perturbe les cinétiques des adaptations physiologiques aux changements photopériodiques, avec des différences en fonction de la dose et du sexe (figure 58).

D'un point du vue écologique, l'accélération des adaptations physiologiques à la photopériode hivernale peut être interprétée comme un avantage adaptatif, permettant à l'individu d'anticiper plus rapidement sa physiologie à la saison à venir. Néanmoins, les animaux peuvent se retrouver temporairement dans un état physiologique en discordance avec leur environnement. De plus, nous avons observé que les cinétiques d'intégration entre mâles et femelles n'évoluaient pas dans le même sens. Par exemple, les femelles exposées au BPA à l'âge adulte présentaient un retard de l'adaptation métabolique à la photopériode courte, mais pas les mâles qui eux présentaient à l'inverse une accélération de l'adaptation. À l'échelle des reproducteurs saisonniers, les conséquences d'une discordance, même temporaire, entre l'état physiologique d'un individu, les ressources de son environnement et l'état physiologique de ses congénères sont à déterminer.

c. Conclusion générale

Mes travaux ont évalué les effets d'une exposition au BPA à différentes périodes du cycle biologique du hamster djungarien, un rongeur qui a la particularité, par rapport aux rongeurs classiques de laboratoire, de présenter une adaptation reproductive et métabolique aux changements saisonniers. Mes résultats ont montré pour la première fois que le BPA peut altérer la fertilité et le comportement maternel des hamsters femelles, la croissance des jeunes et les cinétiques d'adaptations physiologiques aux changements photopériodiques chez les hamsters mâles et femelles adultes, avec un dimorphisme sexuel, mais sans modifier l'intégrité finale de ces adaptations (figure 58). Ainsi, chez le hamster djungarien, les effets d'une exposition au BPA par voie orale dépendent des périodes d'exposition, du sexe, des doses et de la photopériode.

Les rythmes saisonniers des grandes fonctions de l'organisme reposent sur des mécanismes neuroendocriniens impliquant le système mélatoninergique, les hormones thyroïdiennes hypothalamiques, les stéroïdes sexuels et des neuropeptides hypothalamiques. La variété des modes d'action des PE est telle que tous les étages du circuit du contrôle saisonnier de la reproduction et du métabolisme sont des potentielles cibles d'action pour les PE qui sont à ce jour encore trop sous-évaluées.

Le hamster djungarien se révèle être un modèle d'intérêt pour évaluer les effets des PE sur de nombreuses adaptations physiologiques saisonnières (reproduction, métabolisme énergétique, pelage, immunité) mais aussi pour évaluer les potentiels impacts des PE sur les influences maternelles dans le développement du mécanisme photopériodique du fœtus.



Figure 59 : Les principaux effets de l'exposition au BPA sur la physiologie saisonnière au cours du cycle biologique des hamsters djungariens.

Bibliographie

- Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P., Larsen, B. K., Andersen, O., & Narbonne, J. (2006).
 Preliminary study of responses in mussel (Mytilus edilus) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, *78*, S86-S92.
- Abell, A., Ernst, E., & Bonde, J. P. (2000). Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. Scand J Work Environ Health, 26(6), 492-500. doi:10.5271/sjweh.573
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., . . . Uenoyama, Y. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *Journal of Reproduction and Development*, *53*(2), 367-378.
- Ainani, H., Chhaibi, H., Achaâban, M. R., Piro, M., Ouassat, M., Tibary, A., . . . Simonneaux, V. (2022).
 Induced-ovulation in female dromedary camel involves kisspeptin neuron activation by β
 nerve growth factor. *Biol Reprod*, *107*(6), 1490-1502.
- Ainani, H., El Bousmaki, N., Poirel, V. J., Achaâban, M. R., Ouassat, M., Piro, M., . . . El Allali, K. (2020). The dromedary camel displays annual variation in hypothalamic kisspeptin and Arg–Pheamide-related peptide-3 according to sex, season, and breeding activity. *Journal of Comparative Neurology*, 528(1), 36-51.
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, *92*(6-7), 229-236.
- Aloisi, A. M., Della Seta, D., Ceccarelli, I., & Farabollini, F. (2001). Bisphenol-A differently affects estrogen receptors-α in estrous-cycling and lactating female rats. *Neuroscience letters*, 310(1), 49-52.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*, *114*(1), 106-112.
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010).
 Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect*, *118*(9), 1243-1250.
- Amir, S., Shah, S. T. A., Mamoulakis, C., Docea, A. O., Kalantzi, O. I., Zachariou, A., . . . Tsatsakis, A. (2021). Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, 18(4). doi:10.3390/ijerph18041464
- Ancel, C., Bentsen, A. H., Sebert, M.-E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. (2012). Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology*, 153(3), 1352-1363.
- Ancel, C., Inglis, M. A., & Anderson, G. M. (2017). Central RFRP-3 stimulates LH secretion in male mice and has cycle stage–dependent inhibitory effects in females. *Endocrinology*, 158(9), 2873-2883.
- Angelopoulou, E., Quignon, C., Kriegsfeld, L. J., & Simonneaux, V. (2019). Functional implications of RFRP-3 in the central control of daily and seasonal rhythms in reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne), 10,* 183.
- Angle, B. M., Do, R. P., Ponzi, D., Stahlhut, R. W., Drury, B. E., Nagel, S. C., . . . Taylor, J. A. (2013).
 Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol
 A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol, 42,* 256-268. doi:10.1016/j.reprotox.2013.07.017
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A., Klosen, P., Mikkelsen, J., & Simonneaux, V. (2010). Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms*, 25(2), 81-91.
- Anway, M. D., & Skinner, M. K. (2006). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. Endocrinology, 147(6 Suppl), S43-49. doi:10.1210/en.2005-1058
- Arambula, S. E., Belcher, S. M., Planchart, A., Turner, S. D., & Patisaul, H. B. (2016). Impact of Low Dose Oral Exposure to Bisphenol A (BPA) on the Neonatal Rat Hypothalamic and Hippocampal

Transcriptome: A CLARITY-BPA Consortium Study. *Endocrinology*, *157*(10), 3856-3872. doi:10.1210/en.2016-1339

- Atcha, Z., Cagampang, F. R. A., Stirland, J. A., Morris, I. D., Brooks, A. N., Ebling, F. J., . . . Loudon, A. S. (2000). Leptin acts on metabolism in a photoperiod-dependent manner, but has no effect on reproductive function in the seasonally breeding Siberian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology*, 141(11), 4128-4135.
- Attia, A., Mostafa, M., Soliman, S., El-Sebae, A., Nonaka, K., Withyachumnarnkul, B., & Reiter, R. (1990). The organochlorine insecticide 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane (lindane) but not 1, 1, 1trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDT) augments the nocturnal increase in pineal Nacetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels. *Neurochemical research*, *15*, 673-680.
- Attia, A. M., Reiter, R. J., Nonaka, K. O., Mostafa, M. H., Soliman, S. A., & el-Sebae, A. H. (1991). Carbaryl-induced changes in indoleamine synthesis in the pineal gland and its effects on nighttime serum melatonin concentrations. *Toxicology*, *65*(3), 305-314. doi:10.1016/0300-483x(91)90089-j
- Attia, A. M., Reiter, R. J., Stokkan, K. A., Mostafa, M. H., Soliman, S. A., & el-Sebae, A. K. (1991). Parathion (O,O-dimethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothioate) induces pineal melatonin synthesis at night. *Brain Res Bull*, *26*(4), 553-557. doi:10.1016/0361-9230(91)90095-2
- Attina, T. M., Hauser, R., Sathyanarayana, S., Hunt, P. A., Bourguignon, J. P., Myers, J. P., . . Trasande, L. (2016). Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol, 4*(12), 996-1003. doi:10.1016/s2213-8587(16)30275-3
- Avissar-Whiting, M., Veiga, K. R., Uhl, K. M., Maccani, M. A., Gagne, L. A., Moen, E. L., & Marsit, C. J. (2010). Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod Toxicol*, 29(4), 401-406. doi:10.1016/j.reprotox.2010.04.004
- Axelstad, M., Christiansen, S., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P. R., Isling, L. K., . . . Hass, U. (2014).
 Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction*, *147*(4), 489-501. doi:10.1530/rep-13-0447
- Backholer, K., Smith, J. T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., . . . Clarke, I. J. (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, *151*(5), 2233-2243.
- Badura, L. L., & Goldman, B. D. (1992). Prolactin-dependent seasonal changes in pelage: role of the pineal gland and dopamine. *J Exp Zool, 261*(1), 27-33. doi:10.1002/jez.1402610105
- Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P.-P., Matsumoto, H., Sokabe, M., & Chen, L. (2011). Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology*, 152(4), 1562-1571.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., . . . Dehouck, B. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*, *19*(2), 293-301.
- Bank, J. H., Cubuk, C., Wilson, D., Rijntjes, E., Kemmling, J., Markovsky, H., . . . Herwig, A. (2017). Gene expression analysis and microdialysis suggest hypothalamic triiodothyronine (T3) gates daily torpor in Djungarian hamsters (Phodopus sungorus). *Journal of Comparative Physiology B*, 187, 857-868.
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., . . . Coleman, H. G. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports, 7*(1), 1-7.
- Bao, R., Onishi, K. G., Tolla, E., Ebling, F. J., Lewis, J. E., Anderson, R. L., . . . Stevenson, T. J. (2019). Genome sequencing and transcriptome analyses of the Siberian hamster hypothalamus identify mechanisms for seasonal energy balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 116*(26), 13116-13121.
- Barker, D. J. (2003). The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol, 18*(8), 733-736. doi:10.1023/a:1025388901248
- Barr, D. B., Bishop, A., & Needham, L. L. (2007). Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternalfetal unit. *Reprod Toxicol, 23*(3), 260-266. doi:10.1016/j.reprotox.2007.03.003
- Barrett, P., Ebling, F. J., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A. W., Warner, A., . . . Ozanne, D. M. (2007).
 Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology*, *148*(8), 3608-3617.
- Bartness, T. J., Powers, J. B., Hastings, M. H., Bittman, E. L., & Goldman, B. D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res, 15*(4), 161-190. doi:10.1111/j.1600-079x.1993.tb00903.x
- BARTNESS, T. J., & WADE, G. N. (1984). Photoperiodic control of body weight and energy metabolism in Syrian hamsters (Mesocricetus auratus): role of pineal gland, melatonin, gonads, and diet. *Endocrinology*, 114(2), 492-498.
- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2016). Endocrine effects of circadian disruption. *Annu Rev Physiol, 78*, 109-131.
- Benoit, J. (1936). Role de la thyroide dans la gonado-stimulation par la lumiere artificielle chez le *Canard domestique*: Masson.
- Berg, C., Halldin, K., & Brunström, B. (2001). Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 20*(12), 2836-2840.
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. R., & Organization, W. H. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012*: World Health Organization.
- Bergmann, M., Leetz, C., Schindelmeiser, J., Kindermann, E., Kutzner, M., & Hoffmann, K. (1987). Photoperiodically induced changes in the epididymis of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Eur J Endocrinol*, *116*(3_Supplement), S179-S180.
- Bernard, D. J., Losee-Olson, S., & Turek, F. W. (1997). Age-related changes in the photoperiodic response of Siberian hamsters. *Biol Reprod*, *57*(1), 172-177.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, *295*(5557), 1070-1073. doi:10.1126/science.1067262
- Bhardwaj, L., Chauhan, A., Ranjan, A., & Jindal, T. (2018). Persistent organic pollutants in biotic and abiotic components of Antarctic pristine environment. *Earth Systems and Environment*, *2*, 35-54.
- Bilińska, B., Schmalz-Frączek, B., Kotula, M., & Carreau, S. (2001). Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *178*(1-2), 189-198.
- Bittman, E. L., & Karsch, F. J. (1984). Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod, 30*(3), 585-593. doi:10.1095/biolreprod30.3.585
- Bockmann, J., Böckers, T. M., Vennemann, B., Niklowitz, P., Müller, J., Wittkowski, W., . . . Kreutz, M.
 R. (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology*, *137*(5), 1804-1813. doi:10.1210/endo.137.5.8612518
- Bockmann, J., Böckers, T. M., Winter, C., Wittkowski, W., Winterhoff, H., Deufel, T., & Kreutz, M. R. (1997). Thyrotropin expression in hypophyseal pars tuberalis-specific cells is 3,5,3'triiodothyronine, thyrotropin-releasing hormone, and pit-1 independent. *Endocrinology*, 138(3), 1019-1028. doi:10.1210/endo.138.3.5007
- Bolborea, M., Helfer, G., Ebling, F. J., & Barrett, P. (2015). Dual signal transduction pathways activated by TSH receptors in rat primary 1 tanycyte cultures.
- Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., ... Klosen, P. (2011). Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell

adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology, 152*(10), 3871-3883.

- Bolli, A., Galluzzo, P., Ascenzi, P., Del Pozzo, G., Manco, I., Vietri, M. T., . . . Marino, M. (2008). Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. *IUBMB Life*, *60*(12), 843-852. doi:10.1002/iub.130
- Borniger, J. C., Ding, H., Williams, M., Tweedle, M. F., Knopp, M. V., Maurya, S. K., . . . Nelson, R. J. (2016). iMedPub Journals. *Journal of Clinical and Molecular Endocrinology*, 1(2), 07.
- Bottalico, L. N., & Weljie, A. M. (2021). Cross-species physiological interactions of endocrine disrupting chemicals with the circadian clock. *Gen Comp Endocrinol, 301*, 113650.
- Boucher, J. G., Boudreau, A., Ahmed, S., & Atlas, E. (2015). In Vitro Effects of Bisphenol A β-D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environ Health Perspect*, *123*(12), 1287-1293. doi:10.1289/ehp.1409143
- Boudalia, S., Berges, R., Chabanet, C., Folia, M., Decocq, L., Pasquis, B., . . . Canivenc-Lavier, M. C. (2014). A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: effects on maternal behavior, flavor intake and development. *Neurotoxicol Teratol, 41*, 16-26. doi:10.1016/j.ntt.2013.11.002
- Brannick, K. E., Craig, Z. R., Himes, A. D., Peretz, J. R., Wang, W., Flaws, J. A., & Raetzman, L. T. (2012).
 Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth. *Biol Reprod*, *87*(4), 82. doi:10.1095/biolreprod.112.100636
- Braun, J. M. (2017). Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol*, *13*(3), 161-173. doi:10.1038/nrendo.2016.186
- Bridges, R. S. (2015). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol, 36*, 178-196. doi:10.1016/j.yfrne.2014.11.007
- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *Faseb j*, 24(7), 2273-2280. doi:10.1096/fj.09-140533
- Brondizio, E., Díaz, S. M., Settele, J., Ngo, H., Guèze, M., Aumeeruddy-Thomas, Y., . . . Niamir, A. (2019).
 Assessing a planet in transformation: rationale and approach of the IPBES Global Assessment on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Bronson, F. H. (1985). Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod*, 32(1), 1-26. doi:10.1095/biolreprod32.1.1
- Bronson, F. H. (1995). Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol*, 70(2), 141-164. doi:10.1086/418980
- Brown, S. A., & Schibler, U. (2006). [The inter-individual variability of circadian period length in human skin cells]. *Med Sci (Paris), 22*(5), 474-475. doi:10.1051/medsci/2006225474
- Buning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 54, 590-607.
- Butler, M. P., Trumbull, J. J., Turner, K. W., & Zucker, I. (2007). Timing of puberty and synchronization of seasonal rhythms by simulated natural photoperiods in female Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 293*(1), R413-420. doi:10.1152/ajpregu.00216.2007
- Butler, M. P., Turner, K. W., Park, J. H., Butler, J. P., Trumbull, J. J., Dunn, S. P., . . . Zucker, I. (2007).
 Simulated natural day lengths synchronize seasonal rhythms of asynchronously born male
 Siberian hamsters. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 293(1), R402-412.
 doi:10.1152/ajpregu.00146.2007
- Cabaton, N. J., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Zalko, D., Schaeberle, C. M., Askenase, M. H., ... Soto, A. M. (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect*, *119*(4), 547-552. doi:10.1289/ehp.1002559
- Calafat, A. M., & Needham, L. L. (2007). Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals: from basic research to clinical practice, 253-268.

- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect, 116*(1), 39-44. doi:10.1289/ehp.10753
- Calsolaro, V., Pasqualetti, G., Niccolai, F., Caraccio, N., & Monzani, F. (2017). Thyroid disrupting chemicals. *Int J Mol Sci, 18*(12), 2583.
- Campbell, R. E., Gaidamaka, G., Han, S. K., & Herbison, A. E. (2009). Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(26), 10835-10840. doi:10.1073/pnas.0903463106
- Cao, J., Guo, L. H., Wan, B., & Wei, Y. (2011). In vitro fluorescence displacement investigation of thyroxine transport disruption by bisphenol A. *J Environ Sci (China), 23*(2), 315-321. doi:10.1016/s1001-0742(10)60408-1
- Cao, J., Mickens, J. A., McCaffrey, K. A., Leyrer, S. M., & Patisaul, H. B. (2012). Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology*, *33*(1), 23-36. doi:10.1016/j.neuro.2011.11.002
- Caporale, N., Leemans, M., Birgersson, L., Germain, P. L., Cheroni, C., Borbély, G., . . . Testa, G. (2022). From cohorts to molecules: Adverse impacts of endocrine disrupting mixtures. *Science*, *375*(6582), eabe8244. doi:10.1126/science.abe8244
- Caraty, A., Smith, J. T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., . . . Clarke, I. J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, *148*(11), 5258-5267.
- Caro, S. P., Schaper, S. V., Hut, R. A., Ball, G. F., & Visser, M. E. (2013). The case of the missing mechanism: how does temperature influence seasonal timing in endotherms? *PLoS biology*, 11(4), e1001517.
- Carson, R. (1962). Silent spring III. New Yorker, 23.
- Catanese, M. C., & Vandenberg, L. N. (2017). Bisphenol S (BPS) alters maternal behavior and brain in mice exposed during pregnancy/lactation and their daughters. *Endocrinology*, *158*(3), 516-530.
- Cázarez-Márquez, F., Laran-Chich, M. P., Klosen, P., Kalsbeek, A., & Simonneaux, V. (2020). RFRP3 increases food intake in a sex-dependent manner in the seasonal hamster Phodopus sungorus. *J Neuroendocrinol, 32*(5), e12845.
- Cázarez-Márquez, F., Milesi, S., Laran-Chich, M. P., Klosen, P., Kalsbeek, A., & Simonneaux, V. (2019). Kisspeptin and RFRP 3 modulate body mass in Phodopus sungorus via two different neuroendocrine pathways. *J Neuroendocrinol*, *31*(4), e12710.
- Champagne, F. A., Weaver, I. C., Diorio, J., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2006). Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-α1b promoter and estrogen receptor-α expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology*, *147*(6), 2909-2915.
- Chemineau, P., Cognié, Y., & Heyman, Y. (1996). Maîtrise de la reproduction des mammifères d'élevage. *INRAE Productions Animales, 9*(HS), 5-15.
- Chen, J., Okimura, K., & Yoshimura, T. (2020). Light and Hormones in Seasonal Regulation of Reproduction and Mood. *Endocrinology*, *161*(9). doi:10.1210/endocr/bqaa130
- Cheong, R. Y., Porteous, R., Chambon, P., Ábrahám, I., & Herbison, A. E. (2014). Effects of neuronspecific estrogen receptor (ER) α and ERβ deletion on the acute estrogen negative feedback mechanism in adult female mice. *Endocrinology*, *155*(4), 1418-1427.
- Chou, W. C., Chen, J. L., Lin, C. F., Chen, Y. C., Shih, F. C., & Chuang, C. Y. (2011). Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ Health*, 10, 94. doi:10.1186/1476-069x-10-94
- Churchwell, M. I., Camacho, L., Vanlandingham, M. M., Twaddle, N. C., Sepehr, E., Delclos, K. B., . . . Doerge, D. R. (2014). Comparison of life-stage-dependent internal dosimetry for bisphenol A, ethinyl estradiol, a reference estrogen, and endogenous estradiol to test an estrogenic mode of action in Sprague Dawley rats. *Toxicol Sci, 139*(1), 4-20. doi:10.1093/toxsci/kfu021

- Collden, G., Balland, E., Parkash, J., Caron, E., Langlet, F., Prevot, V., & Bouret, S. G. (2015). Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Molecular metabolism, 4*(1), 15-24.
- Combarnous, Y., & Nguyen, T. M. D. (2019). Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics, 7*(1). doi:10.3390/toxics7010005
- Conolly, R. B., & Lutz, W. K. (2004). Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci*, 77(1), 151-157. doi:10.1093/toxsci/kfh007
- Constantin, S., Iremonger, K. J., & Herbison, A. E. (2013). In vivo recordings of GnRH neuron firing reveal heterogeneity and dependence upon GABAA receptor signaling. *Journal of Neuroscience*, 33(22), 9394-9401.
- Corbitt, C., Satre, D., Adamson, L. A., Cobbs, G. A., & Bentley, G. E. (2007). Dietary phytoestrogens and photoperiodic response in a male songbird, the Dark-eyed Junco (Junco hyemalis). *Gen Comp Endocrinol, 154*(1-3), 16-21. doi:10.1016/j.ygcen.2007.06.026
- Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response, 13*(3), 1559325815598308. doi:10.1177/1559325815598308
- Cousins, I., Staples, C., Kleĉka, G., & Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, *8*(5), 1107-1135.
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette, L. J., Jr. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol*, 24(2), 225-239. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.008
- Cresteil, T. (1998). Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit Contam, 15 Suppl,* 45-51. doi:10.1080/02652039809374614
- Curlewis, J., Naylor, A., & McNeilly, A. (1991). Evaluation of a possible role for the dopamine D1 and D2 receptors in the steroid-dependent suppression of luteinizing hormone secretion in the seasonally anoestrous ewe. *J Neuroendocrinol, 3*(4), 387-391.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., . . . Carlton, M. B. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10714-10719.
- da Silva, M. M., Gonçalves, C. F. L., Miranda-Alves, L., Fortunato, R. S., Carvalho, D. P., & Ferreira, A. C. F. (2019). Inhibition of Type 1 lodothyronine Deiodinase by Bisphenol A. *Horm Metab Res*, *51*(10), 671-677. doi:10.1055/a-0919-3879
- Darbre, P. D. (2019). The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *7*, 26-33.
- Dardente, H. (2007). Does a melatonin-dependent circadian oscillator in the pars tuberalis drive prolactin seasonal rhythmicity? *J Neuroendocrinol*, *19*(8), 657-666.
- Dardente, H., Hazlerigg, D. G., & Ebling, F. J. (2014). Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne), 5,* 19.
- Dardente, H., Menet, J. S., Poirel, V. J., Streicher, D., Gauer, F., Vivien-Roels, B., . . . Masson-Pévet, M. (2003). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 114(2), 101-106. doi:10.1016/s0169-328x(03)00134-7
- Dardente, H., & Simonneaux, V. (2022). GnRH and the photoperiodic control of seasonal reproduction: Delegating the task to kisspeptin and RFRP-3. *J Neuroendocrinol*, *34*(5), e13124.
- Dardente, H., Wyse, C. A., Birnie, M. J., Dupré, S. M., Loudon, A. S., Lincoln, G. A., & Hazlerigg, D. G. (2010). A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol, 20*(24), 2193-2198. doi:10.1016/j.cub.2010.10.048
- David Glass, J. (1986). Short photoperiod-induced gonadal regression: effects on the gonadotropinreleasing hormone (GnRH) neuronal system of the white-footed mouse, Peromyscus leucopus. *Biol Reprod*, 35(3), 733-743.

- de Oliveira, A. C., Andreotti, S., Sertie, R. A. L., Campana, A. B., de Proença, A. R. G., Vasconcelos, R. P., . . . Lima, F. B. (2018). Combined treatment with melatonin and insulin improves glycemic control, white adipose tissue metabolism and reproductive axis of diabetic male rats. *Life sciences, 199*, 158-166.
- De Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., & Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10972-10976.
- Decourt, C., Anger, K., Robert, V., Lomet, D., Bartzen-Sprauer, J., Caraty, A., . . . Beltramo, M. (2016). No evidence that RFamide-related peptide 3 directly modulates LH secretion in the ewe. *Endocrinology*, *157*(4), 1566-1575.
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J. L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., . . . Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), 14930-14935. doi:10.1073/pnas.1203574109
- Della Seta, D., Minder, I., Dessì-Fulgheri, F., & Farabollini, F. (2005). Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Res Bull, 65*(3), 255-260. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.11.017
- Demas, G. E., Bowers, R. R., Bartness, T. J., & Gettys, T. W. (2002). Photoperiodic regulation of gene expression in brown and white adipose tissue of Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 282*(1), R114-R121.
- Desai, M., Ferrini, M. G., Han, G., Jellyman, J. K., & Ross, M. G. (2018). In vivo maternal and in vitro BPA exposure effects on hypothalamic neurogenesis and appetite regulators. *Environ Res, 164,* 45-52.
- Desai, M., Ferrini, M. G., Jellyman, J. K., Han, G., & Ross, M. G. (2018). In vivo and in vitro bisphenol A exposure effects on adiposity. *J Dev Orig Health Dis, 9*(6), 678-687. doi:10.1017/s2040174418000600
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., . . . Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 30(4), 293-342. doi:10.1210/er.2009-0002
- Doherty, L. F., Bromer, J. G., Zhou, Y., Aldad, T. S., & Taylor, H. S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*, 1(3), 146-155. doi:10.1007/s12672-010-0015-9
- Dolinoy, D. C., Huang, D., & Jirtle, R. L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32), 13056-13061. doi:10.1073/pnas.0703739104
- Dong, H., & Wade, M. G. (2017). Application of a nonradioactive assay for high throughput screening for inhibition of thyroid hormone uptake via the transmembrane transporter MCT8. *Toxicol In Vitro, 40*, 234-242. doi:10.1016/j.tiv.2017.01.014
- Dopico, X. C., Evangelou, M., Ferreira, R. C., Guo, H., Pekalski, M. L., Smyth, D. J., . . . Todd, J. A. (2015).
 Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun, 6*, 7000. doi:10.1038/ncomms8000
- Dorn, P. B., Chou, C.-S., & Gentempo, J. J. (1987). Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere, 16*(7), 1501-1507.
- Ducker, M. J., Bowman, J. C., & Temple, A. (1973). The effect of constant photoperiod on the expression of oestrus in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl, 19*, 143-150.
- Ducret, E., Anderson, G. M., & Herbison, A. E. (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology*, *150*(6), 2799-2804.

- Dufourny, L., Gennetay, D., Martinet, S., Lomet, D., & Caraty, A. (2016). The content of thyroid hormone receptor α in ewe kisspeptin neurones is not season-dependent. *J Neuroendocrinol*, 28(2).
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., & Oehlmann, J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail Potamopyrgus antipodarum. *Aquat Toxicol, 64*(4), 437-449. doi:10.1016/s0166-445x(03)00102-4
- Dumbell, R. A., Scherbarth, F., Diedrich, V., Schmid, H. A., Steinlechner, S., & Barrett, P. (2015). Somatostatin agonist pasireotide promotes a physiological state resembling short-day acclimation in the photoperiodic male Siberian hamster (Phodopus sungorus). J Neuroendocrinol, 27(7), 588-599.
- Duncan, M. J., & Goldman, B. D. (1984). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. I. Role of the gonads and pituitary. *J Exp Zool, 230*(1), 89-95. doi:10.1002/jez.1402300112
- Ebling, F. J. (2020). Seasonal rhythms of energy metabolism. *The Biochemist, 42*(2), 16-20.
- Ebling, F. J., & Lewis, J. E. (2018). Tanycytes and hypothalamic control of energy metabolism. *Glia*, 66(6), 1176-1184.
- Eckstrum, K. S., Edwards, W., Banerjee, A., Wang, W., Flaws, J. A., Katzenellenbogen, J. A., . . .
 Raetzman, L. T. (2018). Effects of Exposure to the Endocrine-Disrupting Chemical Bisphenol A
 During Critical Windows of Murine Pituitary Development. *Endocrinology*, *159*(1), 119-131.
 doi:10.1210/en.2017-00565
- Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T., & Harazono, A. (2001). Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, *15*(5), 505-523.
- Even, P. C., & Nadkarni, N. A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 303*(5), R459-R476.
- Facciolo, R. M., Alò, R., Madeo, M., Canonaco, M., & Dessì-Fulgheri, F. (2002). Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst(2). *Environ Health Perspect, 110 Suppl 3*(Suppl 3), 397-402. doi:10.1289/ehp.02110s3397
- Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., & Dessì-Fulgheri, F. (2002). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect, 110*(suppl 3), 409-414.
- Farner, D., & Lewis, R. (1973). Field and experimental studies of the annual cycles of white-crowned sparrows. *Journal of reproduction and fertility. Supplement, 19*, 35-50.
- Feoktistova, N. Y., Kropotkina, M., & Naidenko, S. (2010). Seasonal changes of steroid levels in blood plasma of three Phodopus species (Mammalia, Cricetinae). *Biology bulletin, 37*, 659-664.
- Ferguson, K. K., Peterson, K. E., Lee, J. M., Mercado-García, A., Blank-Goldenberg, C., Téllez-Rojo, M.
 M., & Meeker, J. D. (2014). Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reproductive Toxicology*, 47, 70-76.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., & Libertun, C. (2010). Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect*, 118(9), 1217-1222.
- Figala, J., Hoffmann, K., & Goldau, G. (1973). [The annual cycle in the Djungarian Hamster Phodopus sungorus Pallas]. *Oecologia*, *12*(2), 89-118. doi:10.1007/bf00345511
- Flaws, J., Damdimopoulou, P., Patisaul, H. B., Gore, A., Raetzman, L., & Vandenberg, L. N. (2020). Plastics, EDCs and health. *Washington DC: Endocrine Society*.
- Fliers, E., Kalsbeek, A., & Boelen, A. (2014). Beyond the fixed setpoint of the hypothalamus-pituitarythyroid axis. *Eur J Endocrinol*, *171*(5), R197-208. doi:10.1530/eje-14-0285
- Follett, B., & Maung, S. (1978). Rate of testicular maturation, in relation to gonadotrophin and testosterone levels, in quail exposed to various artificial photoperiods and to natural daylengths. *Journal of Endocrinology, 78*(2), 267-280.

- Follett, B., & Nicholls, T. (1985). Influences of thyroidectomy and thyroxine replacement on photoperiodically controlled reproduction in quail. *The Journal of endocrinology*, *107*(2), 211-221.
- Frankowski, R., Grześkowiak, T., Czarczyńska-Goślińska, B., & Zgoła-Grześkowiak, A. (2022). Occurrence and dietary risk of bisphenols and parabens in raw and processed cow's milk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 39*(1), 116-129. doi:10.1080/19440049.2021.1986234
- Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring variations in maternal behavior: Relevance for studies of mood and anxiety. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests, Volume II*, 209-224.
- Franssen, D., Gérard, A., Hennuy, B., Donneau, A.-F., Bourguignon, J.-P., & Parent, A.-S. (2016). Delayed neuroendocrine sexual maturation in female rats after a very low dose of bisphenol A through altered GABAergic neurotransmission and opposing effects of a high dose. *Endocrinology*, 157(5), 1740-1750.
- Freedman, M. S., Lucas, R. J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., & Foster, R. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 284(5413), 502-504. doi:10.1126/science.284.5413.502
- Freret, S., Le Danvic, C., Lurette, A., Chanvallon, A., Experton, C., Frappat, B., . . . Dewez, J. (2018). Gestion de la reproduction en élevages ovins et caprins, conventionnels et biologiques: état des lieux, nouveaux outils et évaluation de leur acceptabilité (REPROBIO). *Innovations Agronomiques, 63*, np.
- Fu, L.-Y., & van den Pol, A. N. (2010). Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *Journal of Neuroscience*, 30(30), 10205-10219.
- Fu, P., & Kawamura, K. (2010). Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut, 158*(10), 3138-3143. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.040
- Fürhacker, M., Scharf, S., & Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, *41*(5), 751-756. doi:10.1016/s0045-6535(99)00466-x
- Galloway, T., Cipelli, R., Guralnik, J., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A. M., . . . Melzer, D. (2010). Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect*, *118*(11), 1603-1608.
- Gámez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Bernasconi, P. S., Carbone, S., Ponzo, O., . . . Reynoso, R. (2015).
 Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats: effects on early folliculogenesis. *Environmental toxicology and pharmacology, 39*(1), 9-15.
- García-Arevalo, M., Alonso-Magdalena, P., Rebelo Dos Santos, J., Quesada, I., Carneiro, E. M., & Nadal, A. (2014). Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice. *PloS one*, *9*(6), e100214.
- Garcia-Segura, L. M., Lorenz, B., & DonCarlos, L. L. (2008). The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction*, *135*(4), 419.
- Garner, W. W., & Allard, H. A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Monthly Weather Review, 48*(7), 415-415.
- Gaston, S., & Menaker, M. (1967). Photoperiodic control of hamster testis. *Science*, 158(3803), 925-928.
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P. L., Corbel, T., Viguié, C., Puel, S., . . . Gayrard, V. (2016).
 Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol
 A. *Environ Int, 86*, 52-59. doi:10.1016/j.envint.2015.10.006
- Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P. L., Servien, R., Viguié, C., Puel, S., . . . Gayrard, V. (2017). Prediction of human prenatal exposure to bisphenol A and bisphenol A glucuronide from an

ovine semi-physiological toxicokinetic model. *Sci Rep, 7*(1), 15330. doi:10.1038/s41598-017-15646-5

- Gaudriault, P., Mazaud-Guittot, S., Lavoué, V., Coiffec, I., Lesné, L., Dejucq-Rainsford, N., . . . Jégou, B. (2017). Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. *Environ Health Perspect*, *125*(8), 087004. doi:10.1289/ehp1014
- Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Collet, S. H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect*, 121(8), 951-956. doi:10.1289/ehp.1206339
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, 76(6), 755-760. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.024
- Gibbs, F. P., & Vriend, J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology*, *109*(5), 1796-1798.
- Gibert-Ramos, A., Ibars, M., Salvadó, M. J., & Crescenti, A. (2019). Response to the photoperiod in the white and brown adipose tissues of Fischer 344 rats fed a standard or cafeteria diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *70*, 82-90.
- Goldman, B., & Brown, S. (1979). Sex differences in serum LH and FSH patterns in hamsters exposed to short photoperiod. *Journal of Steroid Biochemistry*, *11*(1), 531-535.
- Goldman, B. D. (1999). The Siberian hamster as a model for study of the mammalian photoperiodic mechanism. *Melatonin After Four Decades: An Assessment of Its Potential*, 155-164.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, *16*(4), 283-301. doi:10.1177/074873001129001980
- Goldman, B. D., Darrow, J. M., & Yogev, L. (1984). Effects of timed melatonin infusions on reproductive development in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology*, 114(6), 2074-2083. doi:10.1210/endo-114-6-2074
- Goldstone, A. E., Chen, Z., Perry, M. J., Kannan, K., & Louis, G. M. B. (2015). Urinary bisphenol A and semen quality, the LIFE Study. *Reproductive Toxicology*, *51*, 7-13.
- Gonkowski, S., Martín, J., Aparicio, I., Santos, J. L., Alonso, E., & Rytel, L. (2023). Evaluation of Parabens and Bisphenol A Concentration Levels in Wild Bat Guano Samples. *Int J Environ Res Public Health, 20*(3). doi:10.3390/ijerph20031928
- Gonzalez, J. A., Histed, A. R., Nowak, E., Lange, D., Craig, S. E., Parker, C. G., . . . Martyniuk, C. J. (2021). Impact of bisphenol-A and synthetic estradiol on brain, behavior, gonads and sex hormones in a sexually labile coral reef fish. *Hormones and Behavior, 136*, 105043.
- Goodman, R., Jansen, H., Billings, H., Coolen, L., & Lehman, M. (2010). Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *J Neuroendocrinol*, 22(7), 674-681.
- Gorman, M. R., & Zucker, I. (1995). Seasonal adaptations of Siberian hamsters. II. Pattern of change in daylength controls annual testicular and body weight rhythms. *Biol Reprod*, *53*(1), 116-125. doi:10.1095/biolreprod53.1.116
- Gorman, M. R., & Zucker, I. (1997). Environmental induction of photononresponsiveness in the Siberian hamster, Phodopus sungorus. *Am J Physiol, 272*(3 Pt 2), R887-895. doi:10.1152/ajpregu.1997.272.3.R887
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., . . . Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, *145*(9), 4073-4077.
- Grandjean, P., & Jensen, A. A. (2004). Breastfeeding and the weanling's dilemma. *American journal of public health*, *94*(7), 1075-1075.
- Greives, T. J., Kriegsfeld, L. J., & Demas, G. E. (2008). Exogenous kisspeptin does not alter photoperiodinduced gonadal regression in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Gen Comp Endocrinol*, *156*(3), 552-558.

- Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M. J., Germain, D. L. S., & Bernal, J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 94*(19), 10391-10396.
- Gutiérrez-Pascual, E., Martínez-Fuentes, A., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M., & Castano, J. (2007). Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol, 19*(7), 521-530.
- Gutleb, A. C., Cambier, S., & Serchi, T. (2016). Impact of endocrine disruptors on the thyroid hormone system. *Hormone Research in Paediatrics, 86*(4), 271-278.
- Guyomarc'h C. Gwinner, E. (1986). Circannual Rhythms. Endogenous Annual Clocks in the Organization of Seasonal Processes. . *Zoophysiology*, *18*(4), 439.
- Gwinner, E. (1986). Circannual rhythms in the control of avian migrations *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 16, pp. 191-228): Elsevier.
- Hahladakis, J. N., Iacovidou, E., & Gerassimidou, S. (2023). An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and products. *Integr Environ Assess Manag*, 19(1), 45-62. doi:10.1002/ieam.4611
- Hamid, N., Junaid, M., & Pei, D. S. (2021). Combined toxicity of endocrine-disrupting chemicals: A review. *Ecotoxicol Environ Saf, 215*, 112136. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112136
- Han, S. Y., McLennan, T., Czieselsky, K., & Herbison, A. E. (2015). Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42), 13109-13114.
- Hannibal, J., & Fahrenkrug, J. (2006). Neuronal input pathways to the brain's biological clock and their functional significance. *Adv Anat Embryol Cell Biol, 182*, 1-71.
- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O. P., & Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol*, *418*(2), 147-155.
- Hanon, E., Routledge, K., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P. J., & Hazlerigg, D. G. (2010).
 Effect of photoperiod on the thyroid-stimulating hormone neuroendocrine system in the European hamster (Cricetus cricetus). *J Neuroendocrinol, 22*(1), 51-55.
- Hanon, E. A., Lincoln, G. A., Fustin, J.-M., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P. J., & Hazlerigg, D. G. (2008). Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Current Biology*, 18(15), 1147-1152.
- Harbid, A. A., McLeod, B. J., Caraty, A., & Anderson, G. M. (2013). Seasonal changes in RFamide-related peptide-3 neurons in the hypothalamus of a seasonally breeding marsupial species, the brushtail possum (Trichosurus vulpecula). *Journal of Comparative Neurology, 521*(13), 3030-3041.
- Harley, K. G., Gunier, R. B., Kogut, K., Johnson, C., Bradman, A., Calafat, A. M., & Eskenazi, B. (2013).
 Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children.
 Environ Res, 126, 43-50. doi:10.1016/j.envres.2013.06.004
- Hashem, N., El-Azrak, K., El-Din, A. N., Sallam, S., Taha, T., & Salem, M. (2018). Effects of Trifolium alexandrinum phytoestrogens on oestrous behaviour, ovarian activity and reproductive performance of ewes during the non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, *196*, 1-8.
- Hatef, A., Alavi, S. M. H., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., & Linhart, O. (2012). Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 76*, 56-62.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, *295*(5557), 1065-1070. doi:10.1126/science.1069609
- Hau, M., Wikelski, M., & Wingfield, J. C. (1998). A neotropical forest bird can measure the slight changes in tropical photoperiod. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 265*(1391), 89-95.

- Hau, M., Wikelski, M., & Wingfield, J. C. (2000). Visual and nutritional food cues fine-tune timing of reproduction in a neotropical rainforest bird. *Journal of Experimental Zoology*, 286(5), 494-504.
- Hazlerigg, D., & Simonneaux, V. (2015). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *Knobil and Neill's physiology of reproduction, 4*.
- Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., . . . Vom Saal, F. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol, 68*, 3-33. doi:10.1016/j.reprotox.2016.10.001
- Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Chojnacka, K., Kuras, P., Lydka-Zarzycka, M., & Bilinska, B. (2013).
 Photoperiod-dependent effects of 4-tert-octylphenol on adherens and gap junction proteins in bank vole seminiferous tubules. *International Journal of Endocrinology, 2013*.
- Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Galas, J., & Bilińska, B. (2011). Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reproductive Toxicology*, *31*(1), 95-105.
- Heldmaier, G., & Steinlechner, S. (1981). Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Oecologia*, *48*(2), 265-270.
- Helfer, G., Ross, A., & Morgan, P. (2013). Neuromedin U Partly Mimics Thyroid-Stimulating Hormone and Triggers W nt/β-Catenin Signalling in the Photoperiodic Response of F 344 Rats. J Neuroendocrinol, 25(12), 1264-1272.
- Henningsen, J. B., Ancel, C., Mikkelsen, J. D., Gauer, F., & Simonneaux, V. (2017). Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female Syrian hamsters. *Endocrinology*, 158(3), 652-663.
- Henningsen, J. B., Gauer, F., & Simonneaux, V. (2016). RFRP neurons-the doorway to understanding seasonal reproduction in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne), 7*, 36.
- Henson, J. R., Carter, S. N., & Freeman, D. A. (2013). Exogenous T3 elicits long day–like alterations in testis size and the RFamides kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. J Biol Rhythms, 28(3), 193-200.
- Herbison, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(8), 452-466.
- Herbison, A. E., Robinson, J. E., & Skinner, D. C. (1993). Distribution of estrogen receptorimmunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, 57(4), 751-759.
- Herde, M. K., Iremonger, K. J., Constantin, S., & Herbison, A. E. (2013). GnRH neurons elaborate a longrange projection with shared axonal and dendritic functions. *J Neurosci*, 33(31), 12689-12697. doi:10.1523/jneurosci.0579-13.2013
- Herwig, A., de Vries, E. M., Bolborea, M., Wilson, D., Mercer, J. G., Ebling, F. J., . . . Barrett, P. (2013).
 Hypothalamic ventricular ependymal thyroid hormone deiodinases are an important element of circannual timing in the Siberian hamster (Phodopus sungorus). *PloS one*, *8*(4), e62003.
- Herwig, A., Petri, I., & Barrett, P. (2012). Hypothalamic gene expression rapidly changes in response to photoperiod in juvenile Siberian hamsters (Phodopus sungorus). J Neuroendocrinol, 24(7), 991-998. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02324.x
- Herwig, A., Ross, A. W., Nilaweera, K. N., Morgan, P. J., & Barrett, P. (2008). Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obesity facts*, 1(2), 71-79.
- Herwig, A., Wilson, D., Logie, T. J., Boelen, A., Morgan, P. J., Mercer, J. G., & Barrett, P. (2009).
 Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *American Journal of Physiology-Regulatory*, *Integrative and Comparative Physiology*, 296(5), R1307-R1315.
- Hikim, A. S., Amador, A., Klemcke, H., Bartke, A., & Russell, L. (1989). Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in Hamster Testes in active and inactive states spermatogenesis. *Endocrinology*, *125*(4), 1829-1843.
- Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically

regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res, 66*(11), 5624-5632. doi:10.1158/0008-5472.can-06-0516

Hodgert Jury, H., Zacharewski, T. R., & Hammond, G. L. (2000). Interactions between human plasma sex hormone-binding globulin and xenobiotic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *75*(2-3), 167-176. doi:10.1016/s0960-0760(00)00168-0

Hoffman, R. A. (1964). Terrestrial animals in cold: HIbernators. Handbook of Physiology, sect. 4 (R. Dill, ed.). American Physiological Society. Bethesda, MD, pp. 3 79-403

- Hoffman, R. A., & Reiter, R. J. (1965). Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec, 153*(1), 19-21. doi:10.1002/ar.1091530103
- Hoffmann, K. (1982). *The critical photoperiod in the Djungarian hamster Phodopus sungorus.* Paper presented at the Vertebrate circadian systems: structure and physiology.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology*, *16*(2), 117-122.
- Howdeshell, K. L., Peterman, P. H., Judy, B. M., Taylor, J. A., Orazio, C. E., Ruhlen, R. L., . . . Welshons, W. V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect*, *111*(9), 1180-1187. doi:10.1289/ehp.5993
- Hrabovszky, E., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I. n., Hajszán, T., Carpenter, C. D., Liposits, Z., & Petersen, S. L. (2000). Detection of estrogen receptor-β messenger ribonucleic acid and 1251estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*, 141(9), 3506-3509.
- Hu, K.-L., Chang, H.-M., Li, R., Yu, Y., & Qiao, J. (2019). Regulation of LH secretion by RFRP-3–From the hypothalamus to the pituitary. *Frontiers in neuroendocrinology*, *52*, 12-21.
- Huang, D.-Y., Zheng, C.-C., Pan, Q., Wu, S.-S., Su, X., Li, L., . . . Sun, Z.-Y. (2018). Oral exposure of lowdose bisphenol A promotes proliferation of dorsolateral prostate and induces epithelialmesenchymal transition in aged rats. *Scientific Reports*, 8(1), 490.
- HUGHES JR, F. M., & GOROSPE, W. C. (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, *129*(5), 2415-2422.
- Hut, R. A., Paolucci, S., Dor, R., Kyriacou, C. P., & Daan, S. (2013). Latitudinal clines: an evolutionary view on biological rhythms. *Proc Biol Sci, 280*(1765), 20130433. doi:10.1098/rspb.2013.0433
- Ibars, M., Aragonès, G., Ardid-Ruiz, A., Gibert-Ramos, A., Arola-Arnal, A., Suárez, M., & Bladé, C. (2018). Seasonal consumption of polyphenol-rich fruits affects the hypothalamic leptin signaling system in a photoperiod-dependent mode. *Scientific Reports*, 8(1), 13572.
- Ikegami, K., Liao, X. H., Hoshino, Y., Ono, H., Ota, W., Ito, Y., . . . Yoshimura, T. (2014). Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Rep*, 9(3), 801-810. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.006
- Illnerová, H., & Vaněcek, J. (1985). Entrainment of the circadian rhythm in rat pineal Nacetyltransferase activity under extremely long and short photoperiods. *J Pineal Res, 2*(1), 67-78. doi:10.1111/j.1600-079x.1985.tb00628.x
- Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H., & Kato, S. (2003). Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos, 31*(1), 140-144. doi:10.1124/dmd.31.1.140
- Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., . . . Steiner, R. A. (2005). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80(4), 264-272.
- J, B. (1936). Facteurs externes et internes de l'activité sexuelle. I. Stimulation par la lumière de l'activité sexuelle chez le Canard et la Canne domestique. *Bull. Biol. France Belg*, 487-533.
- Jác, M., Sumová, A., & Illnerová, H. (2000). c-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 279*(6), R2270-2276. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2270

- Jacobi, J., Coleman, H., Enriori, P., Parkington, H., Li, Q., Pereira, A., . . . Clarke, I. (2013). Paradoxical effect of gonadotrophin-inhibiting hormone to negatively regulate neuropeptide Y neurones in mouse arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol*, *25*(12), 1308-1317.
- Jafarzadeh Shirazi, M., Zamiri, M., Salehi, M., Moradi, S., Tamadon, A., Namavar, M., . . . Caraty, A. (2014). Differential Expression of RF amide-Related Peptide, a Mammalian Gonadotrophin-Inhibitory Hormone Orthologue, and Kisspeptin in the Hypothalamus of Abadeh Ecotype Does During Breeding and Anoestrous Seasons. J Neuroendocrinol, 26(3), 186-194.
- Jansen, H. T., Cutter, C., Hardy, S., Lehman, M. N., & Goodman, R. L. (2003). Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology*, *144*(8), 3663-3676.
- Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of biomedical research*, *27*(2), 135.
- Jin, Y., Shu, L., Huang, F., Cao, L., Sun, L., & Fu, Z. (2011). Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (Oryzias latipes). *Aquatic Toxicology*, 101(1), 254-260.
- Jin, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., & Fu, Z. (2010). Temperature and photoperiod affect the endocrine disruption effects of ethinylestradiol, nonylphenol and their binary mixture in zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 151(2), 258-263.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., . . . Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol, 65*(2), 205-220. doi:10.1016/s0166-445x(03)00134-6
- Johnson, S., Painter, M., Javurek, A., Ellersieck, M., Wiedmeyer, C., Thyfault, J., & Rosenfeld, C. (2015). Sex-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on metabolic parameters and voluntary physical activity. *J Dev Orig Health Dis, 6*(6), 539-552.
- Johnston, J. (2004). Photoperiodic regulation of prolactin secretion: changes in intra-pituitary signalling and lactotroph heterogeneity. *Journal of Endocrinology, 180*(3), 351-356.
- Johnston, J. D., Ebling, F. J., & Hazlerigg, D. G. (2005). Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (Phodopus sungorus). *Eur J Neurosci, 21*(11), 2967-2974. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04148.x
- Jukic, A. M., Calafat, A. M., McConnaughey, D. R., Longnecker, M. P., Hoppin, J. A., Weinberg, C. R., . .
 McConnaughey, D. R. (2016). Urinary concentrations of phthalate metabolites and bisphenol A and associations with follicular-phase length, luteal-phase length, fecundability, and early pregnancy loss. *Environ Health Perspect*, *124*(3), 321-328.
- Kadokawa, H., Suzuki, S., & Hashizume, T. (2008). Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4), 404-408.
- Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol, 8*(8), 703-718. doi:10.1016/s2213-8587(20)30129-7
- Kalsbeek, A., Cutrera, R. A., Van Heerikhuize, J. J., Van Der Vliet, J., & Buijs, R. M. (1999). GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience*, *91*(2), 453-461. doi:10.1016/s0306-4522(98)00635-6
- Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Palm, I. F., Van Der Vliet, J., Simonneaux, V., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci, 12*(9), 3146-3154. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00202.x
- Kang, J. H., Kito, K., & Kondo, F. (2003). Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J* Food Prot, 66(8), 1444-1447. doi:10.4315/0362-028x-66.8.1444

- Kappers, J. A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, 52*, 163-215.
- Kato, Y., Ikushiro, S., Haraguchi, K., Yamazaki, T., Ito, Y., Suzuki, H., . . . Degawa, M. (2004). A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Toxicological Sciences*, *81*(2), 309-315.
- Katoh, K., Matsuda, A., Ishigami, A., Yonekura, S., Ishiwata, H., Chen, C., & Obara, Y. (2004). Suppressing effects of bisphenol A on the secretory function of ovine anterior pituitary cells. *Cell Biol Int*, 28(6), 463-469. doi:10.1016/j.cellbi.2004.03.016
- Kauffman, A. S., Park, J. H., McPhie-Lalmansingh, A. A., Gottsch, M. L., Bodo, C., Hohmann, J. G., . . .
 Steiner, R. A. (2007). The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *Journal of Neuroscience*, 27(33), 8826-8835.
- Kauffman, R. P., & Castracane, V. D. (2003). Assessing insulin sensitivity.(Controlling PCOS, part 1). *Contemporary OB/GYN, 48*(1), 30-39.
- Keller, M., Vandenberg, L. N., & Charlier, T. D. (2019). The parental brain and behavior: A target for endocrine disruption. *Frontiers in neuroendocrinology*, *54*, 100765.
- Kim, M. J., Kim, H. H., Song, Y. S., Kim, O.-H., Choi, K., Kim, S., . . . Park, Y. J. (2021). DEHP down-regulates Tshr gene expression in rat thyroid tissues and FRTL-5 rat thyrocytes: a potential mechanism of thyroid disruption. *Endocrinology and Metabolism*, 36(2), 447-454.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., . . . Matsumoto, H. (2005).
 Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*, *146*(10), 4431-4436.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., . . . Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci, 84*(2), 249-259. doi:10.1093/toxsci/kfi074
- Klein, D. C., & Moore, R. Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 174(2), 245-262. doi:10.1016/0006-8993(79)90848-5
- Klenke, U., Constantin, S., & Wray, S. (2016). BPA Directly Decreases GnRH Neuronal Activity via Noncanonical Pathway. *Endocrinology*, *157*(5), 1980-1990. doi:10.1210/en.2015-1924
- Klingenspor, M., Dickopp, A., Heldmaier, G., & Klaus, S. (1996). Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS letters, 399*(3), 290-294.
- Klingenspor, M., Niggemann, H., & Heldmaier, G. (2000). Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Journal of Comparative Physiology B*, 170, 37-43.
- Klosen, P., Bienvenu, C., Demarteau, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pévet, P., & Masson-Pévet, M. (2002). The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSHimmunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. J Histochem Cytochem, 50(12), 1647-1657. doi:10.1177/002215540205001209
- Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., & Felder-Schmittbuhl, M. P. (2019). MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *J Pineal Res, 67*(1), e12575. doi:10.1111/jpi.12575
- Klosen, P., Maessen, X., & van den Bosch de Aguilar, P. (1993). PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. J Histochem Cytochem, 41(3), 455-463. doi:10.1177/41.3.8429209
- Klosen, P., Sébert, M. E., Rasri, K., Laran-Chich, M. P., & Simonneaux, V. (2013). TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *The FASEB Journal*, *27*(7), 2677-2686.
- Kohn, M. C., & Melnick, R. L. (2002). Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J Mol Endocrinol, 29*(1), 113-123. doi:10.1677/jme.0.0290113

- Korf, H.-W. (2018). Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen Comp Endocrinol, 258*, 236-243.
- Kortenkamp, A. (2014). Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Current opinion in pharmacology, 19,* 105-111.
- Kotula-Balak, M., Grzmil, P., Chojnacka, K., Andryka, K., & Bilinska, B. (2014). Do photoperiod and endocrine disruptor 4-tert-octylphenol effect on spermatozoa of bank vole (Clethrionomys glareolus)? *Gen Comp Endocrinol, 201*, 21-29.
- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K., . . . Silver, R. (2006).
 Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2410-2415.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., . . . Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, *139*(10), 4252-4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
- Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Front Public Health*, *8*, 553850. doi:10.3389/fpubh.2020.553850
- Kurian, J. R., Keen, K. L., Kenealy, B. P., Garcia, J. P., Hedman, C. J., & Terasawa, E. (2015). Acute Influences of Bisphenol A Exposure on Hypothalamic Release of Gonadotropin-Releasing Hormone and Kisspeptin in Female Rhesus Monkeys. *Endocrinology*, 156(7), 2563-2570. doi:10.1210/en.2014-1634
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., . . . Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol, 16*(1), 45-57. doi:10.1038/s41574-019-0273-8
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, Salmo trutta f. fario. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224.
- Lakind, J. S., Goodman, M., & Mattison, D. R. (2014). Bisphenol A and indicators of obesity, glucose metabolism/type 2 diabetes and cardiovascular disease: a systematic review of epidemiologic research. *Crit Rev Toxicol*, 44(2), 121-150. doi:10.3109/10408444.2013.860075
- Lakind, J. S., Levesque, J., Dumas, P., Bryan, S., Clarke, J., & Naiman, D. Q. (2012). Comparing United States and Canadian population exposures from National Biomonitoring Surveys: bisphenol A intake as a case study. *J Expo Sci Environ Epidemiol, 22*(3), 219-226. doi:10.1038/jes.2012.1
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama, 300*(11), 1303-1310. doi:10.1001/jama.300.11.1303
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013). Tanycyte-like cells form a blood– cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(15), 3389-3405.
- Lassen, T. H., Frederiksen, H., Jensen, T. K., Petersen, J. H., Joensen, U. N., Main, K. M., . . . Andersson, A.-M. (2014). Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environ Health Perspect*, 122(5), 478-484.
- Laws, M. J., Neff, A. M., Brehm, E., Warner, G. R., & Flaws, J. A. (2021). Endocrine disrupting chemicals and reproductive disorders in women, men, and animal models. *Adv Pharmacol*, *92*, 151-190. doi:10.1016/bs.apha.2021.03.008
- Lawson, C. C., Whelan, E. A., Hibert, E. N. L., Spiegelman, D., Schernhammer, E. S., & Rich-Edwards, J.
 W. (2011). Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology (Cambridge, Mass.), 22*(3), 305.
- Le Corre, L., Ivry-del Moral, L., Besnard, P., & Chagnon, M.-C. (2013). Obesogenic effect of bisphenol A in C57Bl/6 mice on high fat diet. *Cahiers de Nutrition et de Diététique, 48*(3), 129-136.

- LeBlanc, M., Festa-Bianchet, M., & Jorgenson, J. T. (2001). Sexual size dimorphism in bighorn sheep (Ovis canadensis): effects of population density. *Canadian Journal of Zoology, 79*(9), 1661-1670.
- Lee, B. E., Park, H., Hong, Y. C., Ha, M., Kim, Y., Chang, N., . . . Ha, E. H. (2014). Prenatal bisphenol A and birth outcomes: MOCEH (Mothers and Children's Environmental Health) study. *Int J Hyg Environ Health*, *217*(2-3), 328-334. doi:10.1016/j.ijheh.2013.07.005
- Lee, N. J., & Herzog, H. (2021). Coordinated regulation of energy and glucose homeostasis by insulin and the NPY system. *J Neuroendocrinol, 33*(4), e12925.
- Legan, S. J., Karsch, F. J., & Foster, D. L. (1977). The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, *101*(3), 818-824. doi:10.1210/endo-101-3-818
- Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479-3489.
- Lehman, M. N., Durham, D. M., Jansen, H. T., Adrian, B., & Goodman, R. L. (1996). Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrous, but not breeding season, ewes. *Endocrinology*, 137(10), 4443-4450.
- Lehman, M. N., & Karsch, F. J. (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*, *133*(2), 887-895.
- León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., . . . Blomenrohr, M. (2014). Physiological roles of gonadotropin-inhibitory hormone signaling in the control of mammalian reproductive axis: studies in the NPFF1 receptor null mouse. *Endocrinology*, 155(8), 2953-2965.
- Leopold, A. S., Erwin, M., Oh, J., & Browning, B. (1976). Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science*, *191*(4222), 98-100.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., & Kloas, W. (2004). Bisphenol A induces feminization in Xenopus laevis tadpoles. *Environ Res*, 94(1), 102-111.
- Lewis, J. E., & Ebling, F. J. (2017). Tanycytes as regulators of seasonal cycles in neuroendocrine function. *Frontiers in Neurology, 8*, 79.
- Li, D. K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Qing, D., Wu, T., . . . Herrinton, L. J. (2010). Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *Journal of andrology*, *31*(5), 500-506.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I., & Smith, J. (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol*, *23*(10), 871-882.
- Lincoln, G., Andersson, H., & Hazlerigg, D. (2003). Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol, 15*(4), 390-397.
- Lincoln, G., Messager, S., Andersson, H., & Hazlerigg, D. (2002). Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(21), 13890-13895. doi:10.1073/pnas.212517599
- Lincoln, G. A., & Clarke, I. J. (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol, 6*(3), 251-260. doi:10.1111/j.1365-2826.1994.tb00580.x
- Lincoln, G. A., Clarke, I. J., Hut, R. A., & Hazlerigg, D. G. (2006). Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science*, *314*(5807), 1941-1944. doi:10.1126/science.1132009
- Lincoln, G. A., Rhind, S. M., Pompolo, S., & Clarke, I. J. (2001). Hypothalamic control of photoperiodinduced cycles in food intake, body weight, and metabolic hormones in rams. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 281*(1), R76-90. doi:10.1152/ajpregu.2001.281.1.R76

- Lite, C., Ahmed, S., Santosh, W., & Seetharaman, B. (2019). Prenatal exposure to bisphenol-A altered miRNA-224 and protein expression of aromatase in ovarian granulosa cells concomitant with elevated serum estradiol levels in F(1) adult offspring. *J Biochem Mol Toxicol*, *33*(6), e22317. doi:10.1002/jbt.22317
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., . . . Pi, H. (2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell death & disease, 4*(6), e676-e676.
- Liu, J. A., Meléndez-Fernández, O. H., Bumgarner, J. R., & Nelson, R. J. (2022). Effects of light pollution on photoperiod-driven seasonality. *Hormones and Behavior, 141*, 105150.
- Liu, X.-Y., Yang, D.-B., Xu, Y.-C., Gronning, M. O., Zhang, F., Wang, D.-H., & Speakman, J. R. (2016). Photoperiod induced obesity in the Brandt's vole (Lasiopodomys brandtii): a model of 'healthy obesity'? *Disease Models & Mechanisms*, 9(11), 1357-1366.
- Liu, X., Lee, K., & Herbison, A. E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*, *149*(9), 4605-4614.
- Lomet, D., Cognié, J., Chesneau, D., Dubois, E., Hazlerigg, D., & Dardente, H. (2018). The impact of thyroid hormone in seasonal breeding has a restricted transcriptional signature. *Cellular and molecular life sciences*, *75*, 905-919.
- Lomet, D., Druart, X., Hazlerigg, D., Beltramo, M., & Dardente, H. (2020). Circuit-level analysis identifies target genes of sex steroids in ewe seasonal breeding. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *512*, 110825.
- Lopez-Rodriguez, D., Franssen, D., Bakker, J., Lomniczi, A., & Parent, A. S. (2021). Cellular and molecular features of EDC exposure: consequences for the GnRH network. *Nat Rev Endocrinol, 17*(2), 83-96. doi:10.1038/s41574-020-00436-3
- López-Rodríguez, D., Franssen, D., Sevrin, E., Gérard, A., Balsat, C., Blacher, S., . . . Parent, A. S. (2019). Persistent vs Transient Alteration of Folliculogenesis and Estrous Cycle After Neonatal vs Adult Exposure to Bisphenol A. *Endocrinology*, *160*(11), 2558-2572. doi:10.1210/en.2019-00505
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in molecular medicine*, *19*(7), 418-427.
- Losa-Ward, S. M., Todd, K. L., McCaffrey, K. A., Tsutsui, K., & Patisaul, H. B. (2012). Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A. *Biol Reprod, 87*(2), 28. doi:10.1095/biolreprod.112.100826
- Louis, G. M. B., Sundaram, R., Sweeney, A. M., Schisterman, E. F., Maisog, J., & Kannan, K. (2014). Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study. *Fertility and sterility*, *101*(5), 1359-1366.
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet, 5*, 407-441. doi:10.1146/annurev.genom.5.061903.175925
- Lucaccioni, L., Trevisani, V., Boncompagni, A., Marrozzini, L., Berardi, A., & Iughetti, L. (2020). Minipuberty: Looking Back to Understand Moving Forward. *Front Pediatr, 8*, 612235. doi:10.3389/fped.2020.612235
- Lucas, R. J., Freedman, M. S., Muñoz, M., Garcia-Fernández, J. M., & Foster, R. G. (1999). Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, *284*(5413), 505-507. doi:10.1126/science.284.5413.505
- Lynch, G. R., Lynch, C. B., & Dingle, H. (1973). Letter: Photoperiodism and adaptive behaviour in a small mammal. *Nature, 244*(5410), 46-47. doi:10.1038/244046a0
- MacKay, H., Patterson, Z. R., & Abizaid, A. (2017). Perinatal Exposure to Low-Dose Bisphenol-A Disrupts the Structural and Functional Development of the Hypothalamic Feeding Circuitry. *Endocrinology*, *158*(4), 768-777. doi:10.1210/en.2016-1718
- Mackay, H., Patterson, Z. R., Khazall, R., Patel, S., Tsirlin, D., & Abizaid, A. (2013). Organizational effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on arcuate nucleus circuitry

controlling food intake and energy expenditure in male and female CD-1 mice. *Endocrinology, 154*(4), 1465-1475. doi:10.1210/en.2012-2044

- Maggi, R., Cariboni, A. M., Marelli, M. M., Moretti, R. M., Andre, V., Marzagalli, M., & Limonta, P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human reproduction update*, *22*(3), 358-381.
- Mahoney, M. M., & Padmanabhan, V. (2010). Developmental programming: impact of fetal exposure to endocrine-disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicol Appl Pharmacol, 247*(2), 98-104. doi:10.1016/j.taap.2010.05.017
- Makowska, K., Staniszewska, M., Bodziach, K., Calka, J., & Gonkowski, S. (2022). Concentrations of bisphenol a (BPA) in fresh pork loin meat under standard stock-farming conditions and after oral exposure A preliminary study. *Chemosphere, 295,* 133816. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133816
- Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., . . . Vigano, L. (2007). In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol, 153*(1-3), 15-24.
- Manzoor, M. F., Tariq, T., Fatima, B., Sahar, A., Tariq, F., Munir, S., . . . Ibrahim, S. A. (2022). An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Front Nutr, 9*, 1047827. doi:10.3389/fnut.2022.1047827
- Mao, J., Kinkade, J. A., Bivens, N. J., & Rosenfeld, C. S. (2021). miRNA changes in the mouse placenta due to bisphenol A exposure. *Epigenomics*, *13*(24), 1909-1919. doi:10.2217/epi-2021-0339
- Mariné-Casadó, R., Domenech-Coca, C., Del Bas, J. M., Bladé, C., Arola, L., & Caimari, A. (2018). Intake of an obesogenic cafeteria diet affects body weight, feeding behavior, and glucose and lipid metabolism in a photoperiod-dependent manner in F344 rats. *Frontiers in physiology*, *9*, 1639.
- Marino, J. L., Holt, V. L., Chen, C., & Davis, S. (2009). Lifetime occupational history and risk of endometriosis. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 233-240.
- Marino, M., Pellegrini, M., La Rosa, P., & Acconcia, F. (2012). Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids*, 77(10), 910-917. doi:10.1016/j.steroids.2012.02.019
- Mark, M., Teletin, M., Antal, C., Wendling, O., Auwerx, J., Heikkinen, S., . . . Dgheem, M. (2007). Histopathology in mouse metabolic investigations. *Current Protocols in Molecular Biology*, 78(1), 29B. 24.21-29B. 24.32.
- Markman, S., Guschina, I. A., Barnsley, S., Buchanan, K. L., Pascoe, D., & Müller, C. T. (2007). Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. *Chemosphere*, 70(1), 119-125. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.045
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., . . . Martin, P. G. (2012). Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*, *55*(2), 395-407.
- Martin, O., Scholze, M., Ermler, S., McPhie, J., Bopp, S. K., Kienzler, A., . . . Kortenkamp, A. (2021). Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environ Int, 146,* 106206. doi:10.1016/j.envint.2020.106206
- Martínez-Sánchez, N. (2020). There and back again: leptin actions in white adipose tissue. *Int J Mol Sci,* 21(17), 6039.
- Mason, A. O., Duffy, S., Zhao, S., Ubuka, T., Bentley, G. E., Tsutsui, K., . . . Kriegsfeld, L. J. (2010). Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (Mesocricetus auratus). *J Biol Rhythms, 25*(3), 176-185.
- Masuno, H., Iwanami, J., Kidani, T., Sakayama, K., & Honda, K. (2005). Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicological Sciences*, *84*(2), 319-327.

- Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol, 14*(2), 149-157. doi:10.1021/tx0001833
- Maung, S. L., & Follett, B. K. (1978). The endocrine control by luteinizing hormone of testosterone secretion from the testis of the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol, 36*(1), 79-89. doi:10.1016/0016-6480(78)90053-9
- McAllan, B., & Geiser, F. (2014). Torpor during reproduction in mammals and birds: dealing with an energetic conundrum. *American Zoologist*, *54*(3), 516-532.
- McCabe, C., Anderson, O. S., Montrose, L., Neier, K., & Dolinoy, D. C. (2017). Sexually Dimorphic Effects of Early-Life Exposures to Endocrine Disruptors: Sex-Specific Epigenetic Reprogramming as a Potential Mechanism. *Curr Environ Health Rep, 4*(4), 426-438. doi:10.1007/s40572-017-0170z
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-214.
- McPartland, J., Dantzker, H. C., & Portier, C. J. (2015). Building a robust 21st century chemical testing program at the U.S. Environmental Protection Agency: recommendations for strengthening scientific engagement. *Environ Health Perspect*, *123*(1), 1-5. doi:10.1289/ehp.1408601
- Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., . . . Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology*, *30*(4), 532-539.
- Meerts, I. A., van Zanden, J. J., Luijks, E. A., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., . . . Brouwer, A. (2000). Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci*, *56*(1), 95-104. doi:10.1093/toxsci/56.1.95
- Melnick, R., Lucier, G., Wolfe, M., Hall, R., Stancel, G., Prins, G., . . . Kohn, M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect*, *110*(4), 427-431. doi:10.1289/ehp.02110427
- Mendiola, J., Jørgensen, N., Andersson, A. M., Calafat, A. M., Ye, X., Redmon, J. B., . . . Swan, S. H. (2010). Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect*, *118*(9), 1286-1291. doi:10.1289/ehp.1002037
- Mercer, J. G., Moar, K. M., Logie, T. J., Findlay, P. A., Adam, C. L., & Morgan, P. J. (2001). Seasonally Inappropriate Body Weight Induced by Food Restriction: Effect on Hypothalamic Gene Expression in Male Siberian Hamsters. *Endocrinology*, 142(10), 4173-4181. doi:10.1210/endo.142.10.8454
- Mercer, J. G., Moar, K. M., Ross, A. W., Hoggard, N., & Morgan, P. J. (2000). Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in Siberian hamster hypothalamus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 278*(1), R271-R281.
- MEYER, S. L., & GOODMAN, R. L. (1985). Neurotransmitters involved in mediating the steroiddependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrous ewes: effects of receptor antagonists. *Endocrinology*, *116*(5), 2054-2061.
- Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X., & Li, D. K. (2011). In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol*, *32*(1), 64-68. doi:10.1016/j.reprotox.2011.03.002
- Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*, *37*(2), 738-758. doi:10.1016/j.etap.2014.02.003
- Milesi, S., Simonneaux, V., & Klosen, P. (2017). Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters. *Scientific Reports, 7*(1), 1-10.
- Mina, A. I., LeClair, R. A., LeClair, K. B., Cohen, D. E., Lantier, L., & Banks, A. S. (2018). CalR: a web-based analysis tool for indirect calorimetry experiments. *Cell metabolism*, *28*(4), 656-666. e651.

- Miyawaki, J., Sakayama, K., Kato, H., Yamamoto, H., & Masuno, H. (2007). Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, *14*(5), 245-252.
- MOENTER, S. M., WOODFILL, C. J. I., & KARSCH, F. J. (1991). Role of the Thyroid Gland in Seasonal Reproduction: Thyroidectomy Blocks Seasonal Suppression of Reproductive Neuroendocrine Activity in Ewes*. *Endocrinology*, *128*(3), 1337-1344. doi:10.1210/endo-128-3-1337
- Moffatt-Blue, C., Sury, J., & Young, K. A. (2006). Short photoperiod-induced ovarian regression is mediated by apoptosis in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Reproduction (Cambridge, England), 131*(4), 771.
- Moghaddam, H. S., Samarghandian, S., & Farkhondeh, T. (2015). Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicology mechanisms and methods*, 25(7), 507-513.
- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci, 35*, 445-462. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128
- Monecke, S., Malan, A., Saboureau, M., & Pévet, P. (2010). Phase shift of the circannual reproductive rhythm in European hamsters by 2 days of long photoperiod. *Neuro Endocrinol Lett, 31*(6), 738-742.
- Monecke, S., Saboureau, M., Malan, A., Bonn, D., Masson-Pévet, M., & Pévet, P. (2009). Circannual phase response curves to short and long photoperiod in the European hamster. *J Biol Rhythms*, 24(5), 413-426. doi:10.1177/0748730409344502
- Monecke, S., Sage-Ciocca, D., Wollnik, F., & Pévet, P. (2013). Photoperiod can entrain circannual rhythms in pinealectomized European hamsters. *J Biol Rhythms, 28*(4), 278-290. doi:10.1177/0748730413498561
- Monje, L., Varayoud, J., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2007). Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol, 194*(1), 201-212. doi:10.1677/joe-07-0014
- Monje, L., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E., & Ramos, J. (2009). Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reproductive Toxicology*, *28*(4), 435-442.
- Monje, L., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2010). Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod Toxicol, 30*(4), 625-634. doi:10.1016/j.reprotox.2010.08.004
- Moralia, M.-A., Quignon, C., Simonneaux, M., & Simonneaux, V. (2022). Environmental disruption of reproductive rhythms. *Frontiers in neuroendocrinology, 66*, 100990.
- Morello, G. M., Hultgren, J., Capas-Peneda, S., Wiltshire, M., Thomas, A., Wardle-Jones, H., . . . Olsson, I. A. S. (2020). High laboratory mouse pre-weaning mortality associated with litter overlap, advanced dam age, small and large litters. *PloS one*, *15*(8), e0236290. doi:10.1371/journal.pone.0236290
- Morgan, P. J. (2000). The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J Neuroendocrinol*, *12*(4), 287-295. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00459.x
- Morgan, P. J., Ross, A. W., Mercer, J. G., & Barrett, P. (2006). What can we learn from seasonal animals about the regulation of energy balance? *Progress in brain research*, *153*, 325-337.
- Morigny, P., Boucher, J., Arner, P., & Langin, D. (2021). Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nature Reviews Endocrinology*, *17*(5), 276-295.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., . . . Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(11), 5185-5190. doi:10.1210/jc.2002-020209
- Murphy, M., Jethwa, P. H., Warner, A., Barrett, P., Nilaweera, K. N., Brameld, J. M., & Ebling, F. J. (2012). Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. *Endocrinology*, *153*(1), 101-112.

- Murray, T. J., Maffini, M. V., Ucci, A. A., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology*, 23(3), 383-390.
- Myers Jr, M. G., & Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature*, 491(7424), 357-363.
- Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., . . . Alonso-Magdalena, P. (2018). Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 176, 16-22. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.014
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S., & Welshons, W. V. (1999). Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 69*(1-6), 343-357.
- Nakane, Y., & Yoshimura, T. (2019). Photoperiodic Regulation of Reproduction in Vertebrates. *Annu Rev Anim Biosci, 7*, 173-194. doi:10.1146/annurev-animal-020518-115216
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., . . . Uno, Y. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature*, *452*(7185), 317-322.
- Namboodiri, M., Sugden, D., Klein, D., Tamarkin, L., & Mefford, I. (1985). Serum melatonin and pineal indoleamine metabolism in a species with a small day/night N-acetyltransferase rhythm. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, 80*(4), 731-736.
- Navarro-Masip, È., Caron, A., Mulero, M., Arola, L., & Aragonès, G. (2023). Photoperiodic Remodeling of Adiposity and Energy Metabolism in Non-Human Mammals. *Int J Mol Sci, 24*(2). doi:10.3390/ijms24021008
- Nehring, I., Staniszewska, M., & Falkowska, L. (2017). Human Hair, Baltic Grey Seal (Halichoerus grypus) Fur and Herring Gull (Larus argentatus) Feathers as Accumulators of Bisphenol A and Alkylphenols. *Arch Environ Contam Toxicol*, *72*(4), 552-561. doi:10.1007/s00244-017-0402-0
- Nesan, D., Feighan, K. M., Antle, M. C., & Kurrasch, D. M. (2021). Gestational low-dose BPA exposure impacts suprachiasmatic nucleus neurogenesis and circadian activity with transgenerational effects. *Science Advances, 7*(22), eabd1159.
- Newbold, R. R., Jefferson, W. N., & Padilla-Banks, E. (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 253-258.
- Newbold, R. R., Jefferson, W. N., & Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect*, *117*(6), 879-885.
- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., & Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproductive Toxicology*, *18*(6), 803-811.
- Ning, G., Bi, Y., Wang, T., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., ... Chen, Y. (2011). Relationship of urinary bisphenol A concentration to risk for prevalent type 2 diabetes in Chinese adults: a cross-sectional analysis. *Annals of internal medicine*, 155(6), 368-374.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., & Yokota, H. (2010). Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect, 118*(9), 1196-1203. doi:10.1289/ehp.0901575
- Norris, D. O., & Jones, R. E. (1987). *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*: Springer.
- Odum, J., Lefevre, P., Tinwell, H., Van Miller, J., Joiner, R., Chapin, R., . . . Ashby, J. (2002). Comparison of the developmental and reproductive toxicity of diethylstilbestrol administered to rats in utero, lactationally, preweaning, or postweaning. *Toxicological Sciences, 68*(1), 147-163.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., . . . Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 364*(1526), 2047-2062. doi:10.1098/rstb.2008.0242

- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., . . . Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104(3), 298-305. doi:10.1289/ehp.96104298
- Oliveira, I. M., Romano, R. M., de Campos, P., Cavallin, M. D., Oliveira, C. A., & Romano, M. A. (2017). Delayed onset of puberty in male offspring from bisphenol A-treated dams is followed by the modulation of gene expression in the hypothalamic–pituitary–testis axis in adulthood. *Reproduction, Fertility and Development, 29*(12), 2496-2505.
- Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., . . . Yoshimura, T. (2008). Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(47), 18238-18242.
- Padungtod, C., Savitz, D. A., Overstreet, J. W., Christiani, D. C., Ryan, L. M., & Xu, X. (2000). Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *J Occup Environ Med*, 42(10), 982-992. doi:10.1097/00043764-200010000-00004
- Palanza, P. L., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S., & vom Saal, F. S. (2002). Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect, 110 Suppl 3*(Suppl 3), 415-422. doi:10.1289/ehp.02110s3415
- Pan, D., Feng, D., Ding, H., Zheng, X., Ma, Z., Yang, B., & Xie, M. (2020). Effects of bisphenol A exposure on DNA integrity and protamination of mouse spermatozoa. *Andrology*, *8*(2), 486-496.
- Park, Y.-J., Rahman, M. S., Pang, W.-K., Ryu, D.-Y., Kim, B., & Pang, M.-G. (2020). Bisphenol A affects the maturation and fertilization competence of spermatozoa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *196*, 110512.
- Patisaul, H. B. (2017). Endocrine Disruption of Vasopressin Systems and Related Behaviors. *Front Endocrinol (Lausanne), 8,* 134. doi:10.3389/fendo.2017.00134
- Patisaul, H. B., Todd, K. L., Mickens, J. A., & Adewale, H. B. (2009). Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology*, *30*(3), 350-357. doi:10.1016/j.neuro.2009.02.010
- Paul, M. J., Park, J. H., Horton, T. H., Alvarez, M. I., Burke, M. K., Place, N. J., & Zucker, I. (2006). Photoperiodic regulation of compensatory testicular hypertrophy in hamsters. *Biol Reprod*, 75(2), 261-269.
- Pellicer-Rubio, M.-T., Boissard, K., Grizelj, J., Vince, S., Freret, S., Fatet, A., & López-Sebastián, A. (2019). Reproduction mastering without hormones in small ruminants. *INRA Productions Animales*, 32(1), 51-66.
- Pellicer-Rubio, M.-T., Ferchaud, S., Fréret, S., Tournadre, H., Fatet, A., Boulot, S., . . . Bocquier, F. (2009). Les méthodes de maîtrise de la reproduction disponibles chez les mammifères d'élevage et leur intérêt en agriculture biologique. *INRAE Productions Animales, 22*(3), 255-270.
- Peña, C. J., Neugut, Y. D., & Champagne, F. A. (2013). Developmental timing of the effects of maternal care on gene expression and epigenetic regulation of hormone receptor levels in female rats. *Endocrinology*, 154(11), 4340-4351.
- Peretz, J., & Flaws, J. A. (2013). Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicol Appl Pharmacol, 271*(2), 249-256. doi:10.1016/j.taap.2013.04.028
- Petri, I., Diedrich, V., Wilson, D., Fernández-Calleja, J., Herwig, A., Steinlechner, S., & Barrett, P. (2016).
 Orchestration of gene expression across the seasons: Hypothalamic gene expression in natural photoperiod throughout the year in the Siberian hamster. *Scientific Reports, 6*(1), 29689.
- Petri, I., Dumbell, R., Scherbarth, F., Steinlechner, S., & Barrett, P. (2014). Effect of exercise on photoperiod-regulated hypothalamic gene expression and peripheral hormones in the seasonal Dwarf Hamster Phodopus sungorus. *PloS one*, *9*(3), e90253.
- Pévet, P., Pitrosky, B., Masson-Pévet, M., Kirsch, R., Canguilhem, B., & Vivien-Roels, B. (1995).
 Physiologial Effects and Biological Activity of Melatonin. *The Pineal Gland and Its Hormones: Fundamentals and Clinical Perspectives*, 33-47.

- Phillips, D. L., Smith, A. B., Burse, V. W., Steele, G. K., Needham, L. L., & Hannon, W. H. (1989). Half-life of polychlorinated biphenyls in occupationally exposed workers. *Arch Environ Health*, 44(6), 351-354. doi:10.1080/00039896.1989.9935905
- Picot, M., Naulé, L., Marie-Luce, C., Martini, M., Raskin, K., Grange-Messent, V., . . . Mhaouty-Kodja, S. (2014). Vulnerability of the neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol a in male mice. *Endocrinology*, 155(2), 502-512.
- Piekarski, D. J., Jarjisian, S. G., Perez, L., Ahmad, H., Dhawan, N., Zucker, I., & Kriegsfeld, L. J. (2014).
 Effects of pinealectomy and short day lengths on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptin, and GnRH in female Turkish hamsters. J Biol Rhythms, 29(3), 181-191.
- Pinson, A., Bourguignon, J. P., & Parent, A. S. (2016). Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. *Andrology*, 4(4), 706-722. doi:10.1111/andr.12211
- Plant, T. M., Ramaswamy, S., & DiPietro, M. J. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G proteincoupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology*, 147(2), 1007-1013.
- Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (2014). Knobil and Neill's physiology of reproduction: Academic Press.
- Poling, M. C., Quennell, J. H., Anderson, G. M., & Kauffman, A. S. (2013). Kisspeptin neurones do not directly signal to RFRP-3 neurones but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. J Neuroendocrinol, 25(10), 876-886.
- Polkowska, J., Cieślak, M., Wańkowska, M., & Wójcik-Gładysz, A. (2015). The effect of short fasting on the hypothalamic neuronal system of kisspeptin in peripubertal female lambs. *Animal Reproduction Science*, *159*, 184-190.
- Post, E., & Forchhammer, M. C. (2008). Climate change reduces reproductive success of an Arctic herbivore through trophic mismatch. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1501), 2367-2373.
- Powers, J., Steel, E., Hutchison, J., Hastings, M., Herbert, J., & Walker, A. (1989). Photoperiodic influences on sexual behavior in male Syrian hamsters. *J Biol Rhythms*, 4(1), 61-78.
- Prendergast, B. J., Gorman, M. R., & Zucker, I. (2000). Establishment and persistence of photoperiodic memory in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5586-5591. doi:10.1073/pnas.100098597
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G., & Beauvillain, J. (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience*, *94*(3), 809-819.
- Prevot, V., Hanchate, N. K., Bellefontaine, N., Sharif, A., Parkash, J., Estrella, C., . . . de Tassigny, X. d. A. (2010). Function-related structural plasticity of the GnRH system: a role for neuronal–glial–endothelial interactions. *Frontiers in neuroendocrinology*, *31*(3), 241-258.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1), 340-345. doi:10.1073/pnas.95.1.340
- Purnelle, G., Gerard, A., Czajkowski, V., & Bourguignon, J.-P. (1997). Pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone by rat hypothalamic explants of GnRH neurons without cell bodies. *Neuroendocrinology*, 66(5), 305-312.
- Qiu, J., Sun, Y., Sun, W., Wang, Y., Fan, T., & Yu, J. (2020). Neonatal exposure to bisphenol A advances pubertal development in female rats. *Mol Reprod Dev, 87*(4), 503-511. doi:10.1002/mrd.23329
- Qiu, J., Wagner, E. J., Rønnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2018). Insulin and leptin excite anorexigenic proopiomelanocortin neurones via activation of TRPC5 channels. J Neuroendocrinol, 30(2). doi:10.1111/jne.12501
- Quignon, C., Beymer, M., Gauthier, K., Gauer, F., & Simonneaux, V. (2020). Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of Rfrp gene expression in mice. *FASEB Journal*, *34*(9), 12072-12082.

- Rasri-Klosen, K., Simonneaux, V., & Klosen, P. (2017). Differential response patterns of kisspeptin and RFamide-related peptide to photoperiod and sex steroid feedback in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). *J Neuroendocrinol, 29*(9), e12529.
- Rebuli, M. E., Cao, J., Sluzas, E., Delclos, K. B., Camacho, L., Lewis, S. M., . . . Patisaul, H. B. (2014). Investigation of the effects of subchronic low dose oral exposure to bisphenol A (BPA) and ethinyl estradiol (EE) on estrogen receptor expression in the juvenile and adult female rat hypothalamus. *Toxicol Sci, 140*(1), 190-203. doi:10.1093/toxsci/kfu074
- Reddy, A. B., Cronin, A. S., Ford, H., & Ebling, F. J. (1999). Seasonal regulation of food intake and body weight in the male Siberian hamster: studies of hypothalamic orexin (hypocretin), neuropeptide Y (NPY) and pro-opiomelanocortin (POMC). *European Journal of Neuroscience*, 11(9), 3255-3264.
- Reiter, R. J. (1972). Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. *Anat Rec*, 173(3), 365-371. doi:10.1002/ar.1091730311
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol, 63*, 647-676. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.647
- Revel, F. G., Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. (2006). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current Biology*, 16(17), 1730-1735.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V., & Mikkelsen, J. D. (2008). RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology*, *149*(3), 902-912.
- Rey, R., Josso, N., & Racine, C. (2000). Sexual Differentiation. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A. S. Shah, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trence, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Reznikov, A., Sachynska, O., Lymareva, A., & Polyakova, L. (2020). Sexual behavior, profile of steroid hormones, and morphology of the medial preoptic nuclei in F1 male rat progeny prenatally exposed to low-dose bisphenol A. *Neurophysiology*, *52*, 388-396.
- Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2020). Adipose tissue: physiology to metabolic dysfunction. *Endotext [Internet]*.
- Rivera, O. E., Varayoud, J. G., Rodriguez, H. A., Santamaría, C. G., Bosquiazzo, V. L., Osti, M., . . . Luque,
 E. H. (2015). Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs.
- Rizwan, M. Z., Poling, M. C., Corr, M., Cornes, P. A., Augustine, R. A., Quennell, J. H., . . . Anderson, G.
 M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology*, *153*(8), 3770-3779.
- Roberts, S. C., Bianco, A. C., & Stapleton, H. M. (2015). Disruption of type 2 iodothyronine deiodinase activity in cultured human glial cells by polybrominated diphenyl ethers. *Chemical research in toxicology, 28*(6), 1265-1274.
- Robinson, J. (1995). Gamma amino-butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility-Supplements only*(49), 221-230.
- Rochester, J. R., Klasing, K. C., Stevenson, L., Denison, M. S., Berry, W., & Millam, J. R. (2009). Dietary red clover (Trifolium pratense) induces oviduct growth and decreases ovary and testes growth in Japanese quail chicks. *Reproductive Toxicology*, *27*(1), 63-71.
- Romanowicz, K., Misztal, T., & Barcikowski, B. (2004). Genistein, a phytoestrogen, effectively modulates luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized ewes during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology*, *79*(2), 73-81.
- Ross, A. W., Helfer, G., Russell, L., Darras, V. M., & Morgan, P. J. (2011). Thyroid hormone signalling genes are regulated by photoperiod in the hypothalamus of F344 rats. *PloS one, 6*(6), e21351.

- Ross, A. W., Russell, L., Helfer, G., Thomson, L. M., Dalby, M. J., & Morgan, P. J. (2015). Photoperiod regulates lean mass accretion, but not adiposity, in growing F344 rats fed a high fat diet. *PloS* one, 10(3), e0119763.
- Rousseau, K., Atcha, Z., Cagampang, F. R. A., Le Rouzic, P., Stirland, J. A., Ivanov, T. R., ... Loudon, A. S. (2002). Photoperiodic regulation of leptin resistance in the seasonally breeding Siberian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology*, *143*(8), 3083-3095.
- Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C., & Soto, A. M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*, 109(7), 675-680.
- Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1-2), 55-62.
- Ruiz-Pino, F., Miceli, D., Franssen, D., Vazquez, M. J., Farinetti, A., Castellano, J. M., . . . Tena-Sempere, M. (2019). Environmentally Relevant Perinatal Exposures to Bisphenol A Disrupt Postnatal Kiss1/NKB Neuronal Maturation and Puberty Onset in Female Mice. *Environ Health Perspect*, 127(10), 107011. doi:10.1289/ehp5570
- Rust, C. C. (1962). Temperature as a modifying factor in the spring pelage change of short-tailed weasels. *Journal of Mammalogy*, *43*(3), 323-328.
- Ryu, V., Zarebidaki, E., Albers, H. E., Xue, B., & Bartness, T. J. (2018). Short photoperiod reverses obesity in Siberian hamsters via sympathetically induced lipolysis and Browning in adipose tissue. *Physiology & Behavior, 190*, 11-20.
- Sáenz de Miera, C., Beymer, M., Routledge, K., Król, E., Selman, C., Hazlerigg, D. G., & Simonneaux, V. (2020). Photoperiodic regulation in a wild-derived mouse strain. *Journal of Experimental Biology*, 223(6), jeb217687.
- Sáenz de Miera, C., Bothorel, B., Jaeger, C., Simonneaux, V., & Hazlerigg, D. (2017). Maternal photoperiod programs hypothalamic thyroid status via the fetal pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(31), 8408-8413. doi:10.1073/pnas.1702943114
- Sáenz de Miera, C., Hanon, E. A., Dardente, H., Birnie, M., Simonneaux, V., Lincoln, G. A., & Hazlerigg, D. G. (2013). Circannual variation in thyroid hormone deiodinases in a short-day breeder. J Neuroendocrinol, 25(4), 412-421.
- Saenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.-P., Pévet, P., Hazlerigg, D. G., & Simonneaux, V. (2014). A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Current Biology*, *24*(13), 1500-1506.
- Salehi, A., Loganathan, N., & Belsham, D. D. (2019). Bisphenol A induces Pomc gene expression through neuroinflammatory and PPARy nuclear receptor-mediated mechanisms in POMC-expressing hypothalamic neuronal models. *Mol Cell Endocrinol, 479,* 12-19. doi:10.1016/j.mce.2018.08.009
- Santamaría, C., Durando, M., de Toro, M. M., Luque, E. H., & Rodriguez, H. A. (2016). Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *158*, 220-230.
- Sargis, R. M., & Simmons, R. A. (2019). Environmental neglect: endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. *Diabetologia*, 62(10), 1811-1822. doi:10.1007/s00125-019-4940-z
- Scanlan, N., Dufourny, L., & Skinner, D. C. (2003). Somatostatin-14 neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with estrogen receptor alpha and somatostatin-28(1-12) immunoreactivity, and activation in response to estradiol. *Biol Reprod*, *69*(4), 1318-1324. doi:10.1095/biolreprod.103.017848
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D. J., Roux, T., . . . Dehouck, B. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4), 1512-1517.
- Schiatt, S., Niklowitz, P., Hoffmann, K., & Nieschlag, E. (1993). Influence of short photoperiods on reproductive organs and estrous cycles of normal and pinealectomized female Djungarian hamsters, Phodopus sungorus. *Biol Reprod*, *49*(2), 243-250.

- Schlatt, S., De Geyter, M., Kliesch, S., Nieschlag, E., & Bergmann, M. (1995). Spontaneous recrudescence of spermatogenesis in the photoinhibited male Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Biol Reprod*, *53*(5), 1169-1177.
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., & Myers, G. (2018). *Cell detection with star-convex polygons*.
 Paper presented at the Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention—
 MICCAI 2018: 21st International Conference, Granada, Spain, September 16-20, 2018, Proceedings, Part II 11.
- Schnitzler, J. G., Celis, N., Klaren, P. H., Blust, R., Dirtu, A. C., Covaci, A., & Das, K. (2011). Thyroid dysfunction in sea bass (Dicentrarchus labrax): Underlying mechanisms and effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormone physiology and metabolism. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 438-447.
- Schuster, C., Gauer, F., Guerrero, H., Lakhdar-Ghazal, N., Pevet, P., & Masson-Pevet, M. (2000). Photic regulation of mt1 melatonin receptors in the Siberian hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J Neuroendocrinol*, *12*(3), 207-216. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00039.x
- Selevan, S. G., Kimmel, C. A., & Mendola, P. (2000). Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3(Suppl 3), 451-455. doi:10.1289/ehp.00108s3451
- Seminara, S. B., Messager, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno Jr, J. S., Shagoury, J. K., . . . Hendrick, A. G. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, 349(17), 1614-1627.
- Sergeeva, A., & Jansen, H. T. (2009). Neuroanatomical plasticity in the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: Seasonal variation in glutamatergic and γ-aminobutyric acidergic afferents. *Journal of Comparative Neurology*, *515*(6), 615-628.
- Sheehan, D. M., Willingham, E., Gaylor, D., Bergeron, J. M., & Crews, D. (1999). No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect*, 107(2), 155-159. doi:10.1289/ehp.99107155
- Sheikh, I. A., Tayubi, I. A., Ahmad, E., Ganaie, M. A., Bajouh, O. S., AlBasri, S. F., . . . Beg, M. A. (2017). Computational insights into the molecular interactions of environmental xenoestrogens 4tert-octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol A (BPA), and BPA metabolite, 4-methyl-2, 4-bis (4hydroxyphenyl) pent-1-ene (MBP) with human sex hormone-binding globulin. *Ecotoxicol Environ Saf, 135*, 284-291. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.005
- Sheng, Z. G., Tang, Y., Liu, Y. X., Yuan, Y., Zhao, B. Q., Chao, X. J., & Zhu, B. Z. (2012). Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol, 259*(1), 133-142. doi:10.1016/j.taap.2011.12.018
- Shi, H., Seeley, R. J., & Clegg, D. J. (2009). Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Frontiers in neuroendocrinology*, *30*(3), 396-404.
- Shi, H., Strader, A. D., Sorrell, J. E., Chambers, J. B., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2008). Sexually different actions of leptin in proopiomelanocortin neurons to regulate glucose homeostasis. Am J Physiol Endocrinol Metab, 294(3), E630-639. doi:10.1152/ajpendo.00704.2007
- Shinomiya, A., Shimmura, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., & Yoshimura, T. (2014). Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone. *Front Endocrinol (Lausanne), 5*, 12. doi:10.3389/fendo.2014.00012
- Silva, J. P. A., Ramos, J. G., Campos, M. S., da Silva Lima, D., de Azevedo Brito, P. V., Mendes, E. P., . . . Santos, F. C. A. (2019). Bisphenol-S promotes endocrine-disrupting effects similar to those promoted by bisphenol-A in the prostate of adult gerbils. *Reproductive Toxicology*, 85, 83-92.
- Simonneaux, V. (2020). A Kiss to drive rhythms in reproduction. *European Journal of Neuroscience*, 51(1), 509-530.
- Simonneaux, V., & Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev, 55*(2), 325-395. doi:10.1124/pr.55.2.2

- Sirohi, D., Al Ramadhani, R., & Knibbs, L. D. (2021). Environmental exposures to endocrine disrupting chemicals (EDCs) and their role in endometriosis: A systematic literature review. *Reviews on Environmental Health*, *36*(1), 101-115.
- Skinner, M. K., Manikkam, M., & Guerrero-Bosagna, C. (2011). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol*, *31*(3), 337-343. doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.012
- Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A., & Clarke, I. J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, *148*(3), 1150-1157.
- Smith, J. T., Coolen, L. M., Kriegsfeld, L. J., Sari, I. P., Jaafarzadehshirazi, M. R., Maltby, M., . . . Ubuka, T. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149(11), 5770-5782.
- Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E., Eacker, S. M., . . . Steiner, R. A. (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 146(7), 2976-2984.
- Smith, J. T., Li, Q., Yap, K. S., Shahab, M., Roseweir, A. K., Millar, R. P., & Clarke, I. J. (2011). Kisspeptin Is Essential for the Full Preovulatory LH Surge and Stimulates GnRH Release from the Isolated Ovine Median Eminence. *Endocrinology*, 152(3), 1001-1012. doi:10.1210/en.2010-1225
- Snijder, C. A., Heederik, D., Pierik, F. H., Hofman, A., Jaddoe, V. W., Koch, H. M., . . . Burdorf, A. (2013).
 Fetal growth and prenatal exposure to bisphenol A: the generation R study. *Environ Health Perspect*, 121(3), 393-398. doi:10.1289/ehp.1205296
- Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescure, C., Nef, S., . . . Hüppi, P. S. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect, 117*(10), 1549-1555.
- Song, Y., Chou, E. L., Baecker, A., You, N. C., Song, Y., Sun, Q., & Liu, S. (2016). Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes*, 8(4), 516-532. doi:10.1111/1753-0407.12325
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S. J., Salehi, A., . . . Nadal, A. (2012). Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor β. *PloS one, 7*(2), e31109.
- Souter, I., Smith, K. W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2013). The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reproductive Toxicology, 42*, 224-231.
- Stahlhut, R. W., Welshons, W. V., & Swan, S. H. (2009). Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect*, *117*(5), 784-789. doi:10.1289/ehp.0800376
- Stapleton, H. M., Kelly, S. M., Pei, R., Letcher, R. J., & Gunsch, C. (2009). Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. *Environ Health Perspect*, 117(2), 197-202.
- Steinlechner, S., & Niklowitz, P. (1992). Impact of photoperiod and melatonin on reproduction in small mammals. *Animal Reproduction Science*, *30*(1-3), 1-28.
- Stetson, M. H., Matt, K. S., & Watson-Whitmyre, M. (1976). Photoperiodism and reproduction in golden hamsters: circadian organization and the termination of photorefractoriness. *Biol Reprod*, 14(5), 531-537. doi:10.1095/biolreprod14.5.531
- Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J., Sirosky, P., Larriera, A., . . . Munoz-de-Toro, M. (2003). Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol, 133*(3), 287-296.
- Storme, L., Deghilage, S., Tepel, J., Turck, D., Prevot, V., Cosson, M., & Deruelle, P. (2018). The first 1000 days of life: Role of healthcare providers to preserve the health capital of tomorrow's adults. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 1027-1035.

- Sugden, L. A., Sugden, D., & Klein, D. C. (1987). Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem*, *262*(2), 741-745.
- Sui, Y., Ai, N., Park, S. H., Rios-Pilier, J., Perkins, J. T., Welsh, W. J., & Zhou, C. (2012). Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ Health Perspect*, 120(3), 399-405. doi:10.1289/ehp.1104426
- Suleiman, J. B., Mohamed, M., & Bakar, A. B. A. (2020). A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 7(1), 103.
- Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., Kováciková, Z., & Illnerová, H. (2004). Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res, 53 Suppl 1*, S167-176.
- Sun, D., Zhou, L., Wang, S., Liu, T., Zhu, J., Jia, Y., . . . Xu, F. (2022). Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in adolescent rat. *Endocrine journal, 69*(2), 217-224.
- Sun, Q., Cornelis, M. C., Townsend, M. K., Tobias, D. K., Eliassen, A. H., Franke, A. A., ... Hu, F. B. (2014).
 Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect*, *122*(6), 616-623. doi:10.1289/ehp.1307201
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett*, *167*(2), 95-105. doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.012
- Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y., & Ozawa, Y. (2001). Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur J Endocrinol, 145*(4), 513-517. doi:10.1530/eje.0.1450513
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., & Taketani, Y. (2004). Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine journal, 51*(2), 165-169.
- Talbi, R., Laran-Chich, M.-P., Magoul, R., El Ouezzani, S., & Simonneaux, V. (2016). Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa. Scientific Reports, 6(1), 36057.
- Tamarkin, L., Hutchison, J., & Goldman, B. (1976). Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. *Endocrinology*, *99*(6), 1528-1533.
- Tan, J. T., Nankivell, V. A., Bilu, C., Shemesh, T., Nicholls, S. J., Zimmet, P., . . . Bursill, C. A. (2019). Highenergy diet and shorter light exposure drives markers of adipocyte dysfunction in visceral and subcutaneous adipose depots of Psammomys obesus. *Int J Mol Sci, 20*(24), 6291.
- Tang, C., Zhang, J., Liu, P., Zhou, Y., Hu, Q., Zhong, Y., . . . Chen, L. (2020). Chronic exposure to low dose of bisphenol A causes follicular atresia by inhibiting kisspeptin neurons in anteroventral periventricular nucleus in female mice. *Neurotoxicology*, *79*, 164-176.
- Teeguarden, J. G., Calafat, A. M., Ye, X., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Gunawan, R., & Graham, M.
 K. (2011). Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol a during high-dietary exposure. *Toxicol Sci*, *123*(1), 48-57. doi:10.1093/toxsci/kfr160
- Teeguarden, J. G., & Hanson-Drury, S. (2013). A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals. *Food Chem Toxicol, 62*, 935-948. doi:10.1016/j.fct.2013.07.007
- Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., & Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol, 288*(2), 131-142. doi:10.1016/j.taap.2015.01.009
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., . . . Tice, R. R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chem Biol Interact, 203*(3), 556-564. doi:10.1016/j.cbi.2013.03.013

- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., . . . Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 364*(1526), 2027-2045. doi:10.1098/rstb.2008.0284
- Thiéry, J.-C., Martin, G. B., Tillet, Y., Caldani, M., Quentin, M., Jamain, C., & Ravault, J.-P. (1989). Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology*, *49*(1), 80-87.
- Thigpen, J. E., Setchell, K. D., Kissling, G. E., Locklear, J., Caviness, G. F., Whiteside, T., . . . Lih, F. B. (2013). The estrogenic content of rodent diets, bedding, cages, and water bottles and its effect on bisphenol A studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *52*(2), 130-141.
- Thomas, P., & Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol, 102*(1-5), 175-179. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.017
- Tischkau, S. A., Jaeger, C. D., & Krager, S. L. (2011). Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology letters, 201*(2), 116-122.
- Titus-Ernstoff, L., Troisi, R., Hatch, E. E., Wise, L. A., Palmer, J., Hyer, M., . . . Noller, K. (2006). Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International journal of epidemiology*, *35*(4), 862-868.
- Togo, Y., Otsuka, T., Goto, M., Furuse, M., & Yasuo, S. (2012). Photoperiod regulates dietary preferences and energy metabolism in young developing Fischer 344 rats but not in same-age Wistar rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 303*(6), E777-E786.
- Tournier, B. B., Dardente, H., Simonneaux, V., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Masson-Pévet, M., & Vuillez, P. (2007). Seasonal variations of clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the European hamster (Cricetus cricetus). *Eur J Neurosci, 25*(5), 1529-1536. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05421.x
- Tournier, B. B., Menet, J. S., Dardente, H., Poirel, V. J., Malan, A., Masson-Pévet, M., . . . Vuillez, P. (2003). Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*, *118*(2), 317-322. doi:10.1016/s0306-4522(03)00008-3
- Tournois, J. (1912). Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis haitifs. *CR Acad. Sci. Paris, 155,* 297-300.
- Townsend, K., & Tseng, Y.-H. (2012). Brown adipose tissue: recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte*, 1(1), 13-24.
- Trasande, L., Attina, T. M., & Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *Jama, 308*(11), 1113-1121. doi:10.1001/2012.jama.11461
- Trasande, L., Zoeller, R. T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J. P., . . . Heindel, J. J. (2016). Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: an updated analysis. *Andrology*, *4*(4), 565-572. doi:10.1111/andr.12178
- Travaglio, M., & Ebling, F. J. (2019). Role of hypothalamic tanycytes in nutrient sensing and energy balance. *Proceedings of the Nutrition Society*, *78*(3), 272-278.
- Troisi, J., Mikelson, C., Richards, S., Symes, S., Adair, D., Zullo, F., & Guida, M. (2014). Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern U.S. *Placenta*, *35*(11), 947-952. doi:10.1016/j.placenta.2014.08.091
- Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H., & Takase, M. (2000). Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neuroscience research*, *36*(4), 261-273.
- Tu, H. M., Kim, S.-W., Salvatore, D., Bartha, T., Legradi, G., Larsen, P. R., & Lechan, R. M. (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*, 138(8), 3359-3368.
- Turek, F. W., & Campbell, C. S. (1979). Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. *Biol Reprod*, 20(1), 32-50. doi:10.1093/biolreprod/20.1.32

- Turek, F. W., Elliott, J. A., Alvis, J. D., & Menaker, M. (1975). Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol Reprod*, 13(4), 475-481.
- Ubuka, T., Bentley, G. E., Ukena, K., Wingfield, J. C., & Tsutsui, K. (2005). Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(8), 3052-3057.
- Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L. J., & Tsutsui, K. (2012). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropininhibitory hormone. *Endocrinology*, *153*(1), 373-385.
- Urbanski, H. F., Doan, A., & Pierce, M. (1991). Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod*, *44*(4), 687-692.
- van Dalum, J., Melum, V. J., Wood, S. H., & Hazlerigg, D. G. (2019). Maternal Photoperiodic Programming: Melatonin and Seasonal Synchronization Before Birth. *Front Endocrinol* (*Lausanne*), 10, 901. doi:10.3389/fendo.2019.00901
- van Rosmalen, L., Riedstra, B., Beemster, N., Dijkstra, C., & Hut, R. A. (2022). Differential temperature effects on photoperiodism in female voles: A possible explanation for declines in vole populations. *Molecular Ecology*, *31*(12), 3360-3373.
- Vandenberg, L. N. (2014). Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitamins & hormones*, 94, 129-165.
- Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response*, *12*(2), 259-276. doi:10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J., & Schoenfelder, G. (2010). Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, *118*(8), 1051-1054. doi:10.1289/ehp.0901717
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., . . . Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33(3), 378-455. doi:10.1210/er.2011-1050
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 24(2), 139-177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- VanderLeest, H. T., Houben, T., Michel, S., Deboer, T., Albus, H., Vansteensel, M. J., . . . Meijer, J. H. (2007). Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Curr Biol, 17*(5), 468-473. doi:10.1016/j.cub.2007.01.048
- Varpe, Ø. (2017). Life History Adaptations to Seasonality. *Integr Comp Biol, 57*(5), 943-960. doi:10.1093/icb/icx123
- Vélez, M. P., Arbuckle, T. E., & Fraser, W. D. (2015). Female exposure to phenols and phthalates and time to pregnancy: the Maternal-Infant Research on Environmental Chemicals (MIREC) Study. *Fertility and sterility*, 103(4), 1011-1020. e1012.
- Viguié, C., Battaglia, D. F., Krasa, H. B., Thrun, L. A., & Karsch, F. J. (1999). Thyroid hormones act primarily within the brain to promote the seasonal inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology*, *140*(3), 1111-1117.
- Vivacqua, A., Recchia, A. G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., . . . Maggiolini, M. (2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*, *22*(3), 275-284. doi:10.1385/endo:22:3:275
- Vogel, S. A. (2012). *Is it Safe?: BPA and the Struggle to Define the Safety of Chemicals*: Univ of California Press.
- Vohra, M. S., Benchoula, K., Serpell, C. J., & Hwa, W. E. (2022). AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *European journal of pharmacology*, *915*, 174611.

- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 15(10), 1281-1287. doi:10.1021/tx025548t
- vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., . . . Welshons, W. V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health*, 14(1-2), 239-260. doi:10.1177/074823379801400115
- Vom Saal, F. S., & Vandenberg, L. N. (2021). Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Endocrinology*, *162*(3). doi:10.1210/endocr/bqaa171
- Vom Saal, F. S., VandeVoort, C. A., Taylor, J. A., Welshons, W. V., Toutain, P.-L., & Hunt, P. A. (2014). Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reproductive Toxicology*, 45, 105-116.
- von Goetz, N., Wormuth, M., Scheringer, M., & Hungerbühler, K. (2010). Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal, 30*(3), 473-487. doi:10.1111/j.1539-6924.2009.01345.x
- Walker, D. M., Goetz, B. M., & Gore, A. C. (2014). Dynamic postnatal developmental and sex-specific neuroendocrine effects of prenatal polychlorinated biphenyls in rats. *Molecular Endocrinology*, 28(1), 99-115.
- Wang, H.-x., Zhou, Y., Tang, C.-x., Wu, J.-g., Chen, Y., & Jiang, Q.-w. (2012). Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study. *Environmental health*, *11*(1), 1-9.
- Wang, H., Ding, Z., Shi, Q. M., Ge, X., Wang, H. X., Li, M. X., . . . Xu, L. C. (2017). Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*, 387, 10-16. doi:10.1016/j.tox.2017.06.007
- Wang, K., Huang, D., Zhou, P., Su, X., Yang, R., Shao, C., & Wu, J. (2022). Bisphenol A exposure triggers the malignant transformation of prostatic hyperplasia in beagle dogs via cfa-miR-204/KRAS axis. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 235*, 113430.
- Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., . . . Ning, G. (2012). Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, *97*(2), E223-227. doi:10.1210/jc.2011-1989
- Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Chen, F., Zhang, J., & Chen, L. (2014). Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in anteroventral periventricular nucleus of female mice. *J Endocrinol, 221*(2), 201-213. doi:10.1530/joe-13-0475
- Wang, Z., Walker, G. W., Muir, D. C. G., & Nagatani-Yoshida, K. (2020). Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. *Environ Sci Technol*, 54(5), 2575-2584. doi:10.1021/acs.est.9b06379
- Warner, A., Jethwa, P. H., Wyse, C. A., l'anson, H., Brameld, J. M., & Ebling, F. J. (2010). Effects of photoperiod on daily locomotor activity, energy expenditure, and feeding behavior in a seasonal mammal. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 298*(5), R1409-R1416.
- Watanabe, M., Yasuo, S., Watanabe, T., Yamamura, T., Nakao, N., Ebihara, S., & Yoshimura, T. (2004).
 Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology*, *145*(4), 1546-1549.
- Watkins, D. J., Téllez-Rojo, M. M., Ferguson, K. K., Lee, J. M., Solano-Gonzalez, M., Blank-Goldenberg, C., . . . Meeker, J. D. (2014). In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environ Res*, *134*, 233-241.
- Weaver, D. R., Liu, C., & Reppert, S. M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol*, *10*(11), 1478-1487. doi:10.1210/mend.10.11.8923472

- WEBSTER, J. R., MOENTER, S. M., WOODFILL, C. J., & KARSCH, F. J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. *Endocrinology*, *129*(1), 176-183.
- Weems, P. W., Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2015). Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Frontiers in neuroendocrinology*, *37*, 43-51.
- Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., . . . Chen, X. (2011). Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*, *152*(8), 3049-3061.
- Weir, J. d. V. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *The Journal of physiology*, *109*(1-2), 1.
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., & vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*, *111*(8), 994-1006. doi:10.1289/ehp.5494
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., . . . Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178-198.
- Whitlock, B., Daniel, J., Wilborn, R., Maxwell, H., Steele, B., & Sartin, J. (2010). Interaction of kisspeptin and the somatotropic axis. *Neuroendocrinology*, *92*(3), 178-188.
- Wieselthier, A. S., & Van Tienhoven, A. (1972). The effect of thyroidectomy on testicular size and on the photorefractory period in the starling (Sturnus vulgaris L.). *Journal of Experimental Zoology*, *179*(3), 331-338.
- Wikelski, M., Hau, M., & Wingfield, J. C. (2000). Seasonality of reproduction in a neotropical rain forest bird. *Ecology*, *81*(9), 2458-2472.
- Wilhelms, K. W., Scanes, C. G., & Anderson, L. L. (2006). Lack of estrogenic or antiestrogenic actions of soy isoflavones in an avian model: the Japanese quail. *Poult Sci, 85*(11), 1885-1889. doi:10.1093/ps/85.11.1885
- Witkin, J. W., Ferin, M., POPILSKIS, S. J., & SILVERMAN, A.-J. (1991). Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology*, *129*(2), 1083-1092.
- Wittkowski, W., Bergmann, M., Hoffmann, K., & Pera, F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Cell Tissue Res, 251*(1), 183-187. doi:10.1007/bf00215463
- Wittkowski, W., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Böckers, T. M. (1999). Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol, 185*, 157-194. doi:10.1016/s0074-7696(08)60151-5
- Wittkowski, W., Hewing, M., Hoffmann, K., Bergmann, M., & Fechner, J. (1984). Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Cell Tissue Res, 238*(1), 213-216. doi:10.1007/bf00215166
- Wolff, M. S., Britton, J. A., Boguski, L., Hochman, S., Maloney, N., Serra, N., . . . Forman, J. (2008). Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environ Res*, *107*(3), 393-400.
- Wolstenholme, J. T., Edwards, M., Shetty, S. R., Gatewood, J. D., Taylor, J. A., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2012). Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology*, 153(8), 3828-3838. doi:10.1210/en.2012-1195
- Wood, S. H., Christian, H. C., Miedzinska, K., Saer, B. R., Johnson, M., Paton, B., . . . Loudon, A. S. (2015).
 Binary Switching of Calendar Cells in the Pituitary Defines the Phase of the Circannual Cycle in Mammals. *Curr Biol, 25*(20), 2651-2662. doi:10.1016/j.cub.2015.09.014
- Woodward, A. R., Percival, H. F., Jennings, M. L., & Moore, C. T. (1993). Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. *Florida Scientist*, 52-63.
- Wu, M., Dumalska, I., Morozova, E., Van Den Pol, A. N., & Alreja, M. (2009). Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *The Journal of physiology*, 587(7), 1401-1411.

- Xi, W., Lee, C. K., Yeung, W. S., Giesy, J. P., Wong, M. H., Zhang, X., . . . Wong, C. K. (2011). Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol, 31*(4), 409-417. doi:10.1016/j.reprotox.2010.12.002
- Xiao, G., Wang, R., Cai, Y., He, G., & Zhou, Z. (2009). Effect of bisphenol A on semen quality of exposed workers: a pilot study. Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi= Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi= Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases, 27(12), 741-743.
- Xie, Q., Kang, Y., Zhang, C., Xie, Y., Wang, C., Liu, J., . . . Huang, D. (2022). The role of kisspeptin in the control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 1353.
- Xiong, J.-J., Karsch, F. J., & Lehman, M. N. (1997). Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropinreleasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology*, 138(3), 1240-1250.
- Xu, J. Y., Wu, L., Shi, Z., Zhang, X. J., Englert, N. A., & Zhang, S. Y. (2017). Upregulation of human CYP2C9 expression by Bisphenol A via estrogen receptor alpha (ERα) and Med25. *Environ Toxicol*, 32(3), 970-978. doi:10.1002/tox.22297
- Xu, X., Chiung, Y. M., Lu, F., Qiu, S., Ji, M., & Huo, X. (2015). Associations of cadmium, bisphenol A and polychlorinated biphenyl co-exposure in utero with placental gene expression and neonatal outcomes. *Reprod Toxicol*, *52*, 62-70. doi:10.1016/j.reprotox.2015.02.004
- Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., & Yoshimura, T. (2004). Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology*, *145*(9), 4264-4267.
- Yang, J., Wang, H., Du, H., Xu, L., Liu, S., Yi, J., ... He, G. (2021). Serum Bisphenol A, glucose homeostasis, and gestational diabetes mellitus in Chinese pregnant women: a prospective study. *Environmental Science and Pollution Research, 28*, 12546-12554.
- Yang, Y.-j., Kim, S.-y., Hong, Y.-p., Ahn, J., & Park, M.-s. (2014). Environmentally relevant levels of bisphenol A may accelerate the development of type II diabetes mellitus in adolescent Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 6, 41-47.
- Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., & Korf, H. W. (2009). Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. J Neurosci, 29(9), 2885-2889. doi:10.1523/jneurosci.0145-09.2009
- Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., & Korf, H. W. (2010). Photoperiodic Control of TSH-β Expression in the Mammalian Pars Tuberalis has Different Impacts on the Induction and Suppression of the Hypothalamo-Hypopysial Gonadal Axis. *J Neuroendocrinol*, 22(1), 43-50.
- Yellon, S., & Goldman, B. (1987). Influence of short days on diurnal patterns of serum gonadotrophins and prolactin concentrations in the male Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Reproduction*, 80(1), 167-174.
- Yellon, S. M., Singh, D., Garrett, T. M., Fagoaga, O. R., & Nehlsen-Cannarella, S. L. (2000). Reproductive, neuroendocrine, and immune consequences of acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin in the Siberian hamster. *Biol Reprod*, *63*(2), 538-543. doi:10.1095/biolreprod63.2.538
- Yeo, S. H., Kyle, V., Morris, P., Jackman, S., Sinnett-Smith, L., Schacker, M., . . . Colledge, W. (2016).
 Visualisation of kiss1 neurone distribution using a kiss1-CRE transgenic mouse. J Neuroendocrinol, 28(11).
- Yeum, D., Ju, S., Cox, K. J., Zhang, Y., Stanford, J. B., & Porucznik, C. A. (2019). Association between periconceptional bisphenol A exposure in women and men and time to pregnancy—The HOPE study. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 33(6), 397-404.
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., . . . Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5339-5346. doi:10.1073/pnas.0308709101

- Yoshimura, T. (2013). Thyroid hormone and seasonal regulation of reproduction. *Frontiers in neuroendocrinology*, 34(3), 157-166.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., & Ebihara, S. (2003). Lightinduced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature, 426*(6963), 178-181.
- Young, J. R., & Jaffe, R. B. (1976). Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*, *42*(3), 432-442. doi:10.1210/jcem-42-3-432
- Zhang, H. Q., Zhang, X. F., Zhang, L. J., Chao, H. H., Pan, B., Feng, Y. M., . . . Shen, W. (2012). Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep*, *39*(5), 5651-5657. doi:10.1007/s11033-011-1372-3
- Zhou, Q., Miao, M., Ran, M., Ding, L., Bai, L., Wu, T., . . . Li, D. K. (2013). Serum bisphenol-A concentration and sex hormone levels in men. *Fertil Steril, 100*(2), 478-482. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.017
- Zimova, M., Hackländer, K., Good, J. M., Melo-Ferreira, J., Alves, P. C., & Mills, L. S. (2018). Function and underlying mechanisms of seasonal colour moulting in mammals and birds: what keeps them changing in a warming world? *Biol Rev Camb Philos Soc, 93*(3), 1478-1498. doi:10.1111/brv.12405
- Ziv-Gal, A., Wang, W., Zhou, C., & Flaws, J. A. (2015). The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol Appl Pharmacol, 284*(3), 354-362. doi:10.1016/j.taap.2015.03.003
- Zoeller, R. T., & Rovet, J. (2004). Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. J Neuroendocrinol, 16(10), 809-818. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01243.x
- Zucker, I. (2001). Circannual rhythms mammals. *Circadian clocks*, 509-528.


Annexe 1 : Détection des neurones marqués au Rfrp avec QuPath.

Sur QuPath, les paramètres morphologiques permettant la détection « nucléaire » des neurones à RFRP-3 ont d'abord été testés sur une sélection aléatoire de plusieurs fragments d'images de coupes marquées (> 10, fonction *sparse image*). Dans nos conditions expérimentales (prise d'images, marquages), les paramètres morphologiques nucléaires et d'intensité de la densité optique du script ci-dessous ont permis de détecter une majorité de neurones marqués.

setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB');

set Color Deconvolution Stains

runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.WatershedCellDetection',

'{"detectionImageBrightfield":"Opticaldensitysum","requestedPixelSizeMicrons":0.44,"backgroundRa diusMicrons":7.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":3.0,"sigmaMicrons":3 .0,"minAreaMicrons":30.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.2,"maxBackground":2.0,"watershe dPostProcess":false,"excludeDAB":false,"cellExpansionMicrons":0.0,"includeNuclei":true,"smoothBo undaries":true,"makeMeasurements":true})

Annexe 2 : Détection des neurones marqués à la Kisspeptine avec StarDist/QuPath (script).

Les paramètres de détection cellulaire du modèle pré-entraîné « dsb2018_heavy_augment.pb » appliqué à la détection de l'immunomarquage des neurones à kisspeptine sont présentés en rouge, en gras. En gris italique est précisé les fonctions de chaque commande.

import qupath.ext.stardist.StarDist2D

import qupath.lib.images.servers.ColorTransforms

import qupath.imagej.gui.ImageJMacroRunner

// spécifier le modèle pré-entraîné

def pathInput = buildFilePath(PROJECT_BASE_DIR)

def pathModel = 'C:/pathinput_dsb2018_heavy_augment.pb'

def stardist_segmentation = StarDist2D.builder(pathModel)

.threshold(0.75) // définit le seuil de probabilité de détection

.normalizePercentiles(1, 99) // normalise les intensités de l'image par rapport à celles utilisées dans le modèle pré-entraîné

.pixelSize(0.22) // résolution de la détection (dépend de la résolution de l'image, ici 1 pixel = $0.22\mu m^2$)

.includeProbability(true)

.channels(

//ColorTransforms.createColorDeconvolvedChannel(getCurrentImageData().getColorDeconvolutionSt
ains(),
1),

ColorTransforms.createColorDeconvolvedChannel(getCurrentImageData().getColorDeconvolutionSta ins(), 2)) // déconvolution des couleurs de l'image et sélection du canal sur lequel la détection sera réalisée (ici, on sélectionne le canal 2 correspondant au canal de la DAB)

.cellExpansion(0.5) // délimite la cellule par expansion de la taille du noyau

.cellConstrainScale(1.5) // limite l'expansion cellulaire (expansion maximale de la taille du noyau)

.ignoreCellOverlaps(true) // définir TRUE si les chevauchements entre cellules sont à détecter

.measureShape() // ajoute des mesures morphologiques pour chaque cellule détectée (aire, périmètre du noyau, cytoplasme, cellule entière)

.measureIntensity() // ajoute des mesures d'intensité dans chaque compartiment cellulaire (moyenne, minimale, maximale, dans noyau, cytoplasme, cellule entière)

.build()

def imageData = getCurrentImageData()

def hierarchy = imageData.getHierarchy()

def annotations = hierarchy.getAnnotationObjects()

stardist_segmentation.detectObjects(imageData, annotations) // lance la détection uniquement dans les coupes annotées (sur chaque coupe, on a tracé un rectangle au niveau de l'hypothalamus (annotation) pour limiter la détection à notre région d'intérêt)

def toDelete = getDetectionObjects().findAll {measurement(it, 'Nucleus: Area μ m^2') < 40 && measurement(it, 'Nucleus: DAB OD mean') < 0.1}//removeObjects(toDelete, true) // exclure les cellules ayant une aire nucléaire < 40 μ m² et une intensité nucléaire de coloration DAB < 0.1

println 'Done!'

<u>Annexe 3 :</u> Conditions utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Les conditions de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse en tandem sont présentées pour la purification, la détection et la quantification de la testostérone et du BPA-glucuronide ainsi que pour leurs homologues deutérés respectifs. Le débit était fixé à 90 μ l/min sur une colonne ZORBAX SB-C18 (150 x 1mm, 3,5 μ m) à 40°C.

1) Testostérone

	Mobile phase					
Gradient	ACN	H ₂ O	Formic acid			
Mobile phase A	1%	98.9%	0.1%			
Mobile phase B	99.9%	0	0.1%			

HPLC gradient							
Time (min)	0	2.5	5	11	13	13.5	20
% B mobile phase	0	0	20	98	98	0	0

MS parameters					
Mode	positive				
Spray voltage	3,500 V				
Nebulizer gas	Nitrogen				
Desolvation (nitrogen) sheath gas	18 Arb				
Aux gas	7 Arb				
Ion transfer tube temperature	297°C				
Vaporizer temperature	131°C				
Q1 and Q3 resolutions	0.7 FWHM				
Collision gas (CID, argon) pressure	2 mTorr				

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Ion product type	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Testosterone-keto	Positive	403.3	152.11	Qualification	40.64	158
Testosterone-keto	Positive	403.3	164.11	Qualification	41.29	158
Testosterone-keto	Positive	403.3	344.22	Quantification	20.41	158
2H4-testo-keto-407	Positive	407.32	153.11	Qualification	41.19	179
2H4-testo-keto-407	Positive	407.32	165.11	Qualification	42.76	179
2H4-testo-keto-407	Positive	407.32	348.22	Quantification	20.61	179

MS ionization, selection, fragmentation and identification parameters

2) BPA-glucuronide

	Mobile phase					
Gradient	ACN	H ₂ O	Formic acid			
Mobile phase A	1%	98.9%	0.1%			
Mobile phase B	99.9%	0	0.1%			

HPLC gradient							
Time (min)	0	2.5	5	9	10.5	11.5	16
% B mobile phase	0	0	20	98	98	0	0

MS parameters	
Mode	Negative
Spray voltage	2500 V
Nebulizer gas	Nitrogen
Desolvation (nitrogen) sheath gas	18 Arb
Aux gas	7 Arb
Ion transfer tube temperature	297°C
Vaporizer temperature	131°C
Q1 and Q3 resolutions	0.7 FWHM
Collision gas (CID, argon) pressure	2 mTorr

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Ion product type	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
BPA-Glucuronide	Negative	402.98	175.05	Qualification	15.20	185
BPA-Glucuronide	Negative	402.98	212.04	Qualification	37.40	185
BPA-Glucuronide	Negative	402.98	227.04	Quantification	26.28	185
BPA-Glucuronide- ¹³ C12	Negative	415.35	174.98	Qualification	14.55	225
BPA-Glucuronide- ¹³ C12	Negative	415.35	224.04	Qualification	36.74	225
BPA-Glucuronide- ¹³ C12	Negative	415.35	239.02	Quantification	27.49	225

MS ionization, selection, fragmentation and identification parameters

Annexe 4 : Estimation du volume testiculaire (EVT).

Cette expérience a eu pour objectif de développer une méthode du suivi longitudinal non-invasif de l'état de reproduction des hamsters djungariens mâles lors des protocoles de transferts photopériodiques ou des suivis en période pubertaire. J'ai cherché à établir des corrélations entre le poids des testicules, le volume testiculaire estimé (EVT) et la concentration plasmatique en testostérone chez des mâles hamsters djungariens jeunes et adultes pour définir des EVT témoignant d'activité testiculaire fonctionnelle.



L'EVT corrèle davantage avec le poids des testicules qu'avec la concentration plasmatique en testostérone. Celle-ci est relativement basale pour tous les animaux, probablement car elle a été mesurée entre 4 à 6h avant l'extinction des lumières donc avant le pic de sécrétion journalier.

D'après Schlatt et coll. (1995) une fonctionnalité gonadique est retrouvée pour les testicules de hamsters djungariens de poids > 300 mg (présence de spermatides). Dans nos conditions de mesure, un EVT de **100 mm³** correspond approximativement à la valeur à laquelle les paires de testicules pèsent 300 mg et à laquelle on retrouve des concentrations circulantes en testostérone de plus de 1ng/ml ainsi qu'une spermatogénèse fonctionnelle (Schlatt *et al.*, 1995). C'est pourquoi, ce seuil a été déterminé dans nos expériences de suivis de la puberté et des adaptations photopériodiques.

Annexe 5 : Analyses en Composantes Principales avec R (script).

Afin de discuter de l'existence d'un dimorphisme sexuel dans les paramètres neuroendocriniens et somatiques suivis, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide du logiciel R (v4.2.2) pour faciliter la visualisation des données, étant donné qu'un grand nombre de paramètres physiologiques ont été recueillis. Le package MissMDA a été utilisé pour imputer les ensembles de données incomplets et l'ACP finale a été réalisée avec le package FactoMineR.

Après installation du package FactoMineR dans R commander :

data <- read.table("D:/pathinput", header=TRUE, sep="\t", na.strings="NA", dec=".", row.names=1, strip.white=TRUE) // importer le tableau de données (.txt)

install.packages("missMDA") // impute les données manquantes à l'aide de méthodes de composantes principales qui tiennent compte des similitudes entre les observations et de la relation entre les variables

library(missMDA, pos=18)

nb <- estim_ncpPCA(data, quali.sup=1, method.cv = "Kfold", verbose = FALSE) // estime le nombre de dimension à imputer ; la première colonne du tableau est qualitative (traitement) -> quali.sup=1

nb

res.comp <- imputePCA(*data*, quali.sup=1, ncp = *nbdim*) // indiquer le nombre de dimension à imputer à la place de nbdim

res.comp\$completeObs

res.pca <- PCA(res.comp\$completeObs, quali.sup=1) // la PCA est réalisée sur le jeu de données complété

summary (res.pca) // résume les résultats de la PCA (nombre de composantes, proportion de variance expliquée par les composantes)

dimdesc(res.pca) // décrit chaque composante principale

// ci-dessous, les packages et lignes de code utilisés pour la représentation graphique en biplot (répartition des individus et contribution des variables en fonction des composantes principales 1 et 2) dont les détails sont retravaillés sur Adobe Illustrator après l'export en pdf

install.packages("factoextra")

library(factoextra)

library(ggplot2)

fviz_pca(res.pca)

```
p <- fviz_pca_biplot(res.pca, geom.ind = "point", fill.ind = data$Treatment, col.ind = "black",
pointshape = 21, pointsize = 2, addEllipses = TRUE, ellipse.type = "confidence", ellipse.level = 0.95,
col.var = "contrib", gradient.cols = NULL, legend.title = list(fill = "Treatment", color = "Contrib", alpha
= "Contrib"), repel = TRUE)
```

```
pdf("pca.pdf",height=8, width=8, useDingbats=FALSE)
```

plot(p)

dev.off()

<u>Annexe 6</u> : Environmental disruption of reproductive rhythms.



Contents lists available at ScienceDirect

Frontiers in Neuroendocrinology





Environmental disruption of reproductive rhythms



Marie-Azélie Moralia, Clarisse Quignon, Marine Simonneaux, Valérie Simonneaux

Université de Strasbourg, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords: Artificial light at night Shift work Endocrine-disrupting chemicals Reproduction Circadian rhythms Seasonal rhythms Melatonin GnRH Kisspeptin RFRP-3

ABSTRACT

Reproduction is a key biological function requiring a precise synchronization with annual and daily cues to cope with environmental fluctuations. Therefore, humans and animals have developed well-conserved photoneuroendocrine pathways to integrate and process daily and seasonal light signals within the hypothalamicpituitary-gonadal axis. However, in the past century, industrialization and the modern 24/7 human lifestyle have imposed detrimental changes in natural habitats and rhythms of life. Indeed, exposure to an excessive amount of artificial light at inappropriate timing because of shift work and nocturnal urban lighting, as well as the ubiquitous environmental contamination by endocrine-disrupting chemicals, threaten the integrity of the daily and seasonal timing of biological functions. Here, we review recent epidemiological, field and experimental studies to discuss how light and chemical pollution of the environment can disrupt reproductive rhythms by interfering with the photoneuroendocrine timing system.

1. The rhythms of life

Because Earth makes a yearly revolution around the sun while rotating around its tilted (23.5°) axis in one day, living organisms are exposed to annual and daily variations in geophysical factors, such as light, temperature, and humidity, which in turn modulate food availability and quality. Animals, and notably mammals, have developed adaptive behavioral and biological strategies to survive these cyclic environmental changes. Importantly, these adaptive processes do not result from a passive tracking of the environmental cycles, but they also involve endogenous timers (clocks and calendars). This complex internal timing system is critical as it allows biological functions to both anticipate upcoming expected cyclic environmental changes and also adapt to unexpected changes in the amplitude and phase of these cycles. These internal timers are built on a complex molecular machinery, which period length and phasing with environmental cues may vary among species, individuals, and even throughout the lifetime, thus requesting robust synchronizing processes to harmonize daily and seasonal biological cycles within and between individuals. Several environmental factors exhibiting daily and/or seasonal changes, notably light, temperature, food availability, pathogen exposure, and social interaction, have the property to indicate external time (zeitgeber). Among these, the astronomical change in light intensity and duration is the most potent factor to synchronize biological activities with the best time of the day and the best period of the year.

1.1. A photoneuroendocrine pathway behind the rhythms of life

In mammals, the pathway allowing light to synchronize daily and seasonal functions is known as the photoneuroendocrine pathway encompassing light-sensitive cells in the retina, molecular clocks, as well as nervous and hormonal outputs (Simonneaux and Ribelayga, 2003; Fig. 1). The proper functioning of this photoneuroendocrine pathway is crucial for the environmental adaptation of biological functions, notably reproduction which is the focus of this review. Indeed, reproductive activity exhibits both daily variations, with an increase at the beginning of the active period to facilitate reproductive success (Simonneaux and Bahougne, 2015 for review), and marked seasonal variations, with breeding activity adjusted to ensure offspring's birth and weaning at a period of optimal temperature and food resources availability (Dardente, 2012; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Karsch et al., 1984; Reiter, 1993 for reviews).

The pivotal structure of this photoneuroendocrine pathway is the master circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus (Ralph et al., 1990). Each SCN neuron contains a complex molecular clockwork involving transcription-translation loops, which generate cycles with a period of about one day (circadian cycle) (Takahashi, 2017 for review). The transcriptional dimer CLOCK/BMAL1 is central to this oscillating system as it binds to specific E-Box response elements to induce the transcription of the clock genes *Pers* and *Crys* producing PER/CRY complexes, which in turn displace CLOCK/BMAL1

https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100990

Received 1 November 2021; Received in revised form 6 January 2022; Accepted 21 February 2022 Available online 26 February 2022 0091-3022/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR 3212), 8 allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France. *E-mail address:* simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr (V. Simonneaux).

binding at E-Box, and therefore decreases its transcriptional activity. The circadian period is stabilized by additional transcriptional regulations, notably the Rev-Erba and RORß secondary loop, and posttranscriptional activities controlling clock protein degradation. All SCN neurons are interconnected so that the whole structure can generate persistent and stable endogenous rhythms, even when isolated in culture, with a circadian period characteristic of each species. The circadian clock also uses the CLOCK/BMAL1 dimer to regulate the expression of SCN "clock-controlled" genes encoding signaling molecules, such as arginine vasopressin (AVP) synthesized in neurons located in the dorsomedial part of the SCN (Jin et al., 1999). The temporal SCN signal is forwarded to intra-hypothalamic and extra-hypothalamic targets, via efferent neuronal pathways and humoral outputs, to time downstream biological activities (Stephan et al., 1981; Silver et al., 1996). Further studies, using transgenic rodent models in which exogenous luciferase protein is expressed under a Per1- or Per2-driven circadian rhythm, demonstrated that several central and peripheral structures, outside of the SCN, also host similar circadian clocks (Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004). These secondary clocks are reported to regulate local rhythmic events under the control of the main SCN clock, which operates as a conductor of the body's circadian system (Dibner et al. 2010; Kalsbeek et al., 2006).



1.2. Light synchronizes the clock

If isolated from environmental zeitgebers, the SCN-controlled circadian system free runs and biological rhythms become out of phase of the astronomical cycles, compromising individual survival. Therefore, the SCN circadian period has to be synchronized into a daily (exactly 24 h) period to adjust the circadian system with the astronomical time. Light, perceived by the retina, is by far the most potent synchronizer of the circadian biological rhythms (Best et al., 1999; Daan, 1977; Golombek and Rosenstein, 2010 for review). About 20 years ago, it was discovered that the light-sensitive cells primarily involved in the SCN clock synchronization are not the image-forming rod and cone photoreceptors, but the non-image-forming intrinsically photosensitive retinal ganglion cells containing the pigment melanopsin especially sensitive to blue light (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002; Panda et al., 2002; Provencio et al., 2002). Indeed, these melanopsin retinal ganglion cells project directly to the ventrolateral part of the SCN, which contains vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and gastrin-releasing peptide (GRP)-expressing neurons (Antle and Silver, 2005; Fernandez et al., 2016a). Light activation of the melanopsin retinal ganglion cells induces the release of glutamate and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) which in turn modulate the phase of the molecular

> Fig. 1. Environmental disruption of reproductive rhythms by exposure to artificial light at night and endocrine-disrupting chemicals. The suprachiasmatic nuclei (SCN), integrating daily light/dark signals, and the melatoninproducing pineal gland, forwarding photoperiodic signals, respectively synchronize daily and seasonal rhythms of the hypothalamo-pituitarygonadal axis. Kisspeptin and RFRP-3 neurons acting upstream the GnRH neurons receive both daily information from the VIP-/AVP-expressing cells in the SCN to synchronize the daily timing of the preovulatory LH surge, and seasonal information from the melatonin-driven variations in hypothalamic T3 to synchronize annual timing of reproduction. However, disruption of the light/ dark and/or the photoperiod signals by artificial light at night, or exposure to endocrinedisrupting chemicals (EDCs) alter reproductive timing by acting on melatonin production, T3, and sex steroids signaling. AVP, arginine vasopressin; EDCs, endocrine-disrupting chemicals; FSH, folliculo-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; LP, long photoperiod; RFRP-3, (Arg)(Phe)related peptide-3; SCN, suprachiasmatic nuclei; SP, short photoperiod; T3, triiodothyronine; VIP, vasoactive intestinal polypeptide.

clockwork (Chen et al., 1999; Hannibal, 2006 for review). Consequently, the daily light/dark alternation, transmitted *via* the retino-hypothalamic tract, synchronizes to a precise 24 h-period the circadian clock and its downstream physiological and behavioral rhythms (sleep/wake, cardiovascular activity, metabolism, reproduction, mood, as well as most circulating hormones). These daily rhythms, although coordinated to each other under the SCN conductor, are not all in the same phase because their maximum and minimum are adjusted to the organism's needs around the clock (Smolensky and Lamberg, 2000). Therefore, proper alignment between light, the SCN clock, and the downstream biological rhythms produces a temporal order essential for organisms' health and survival.

1.3. Light, melatonin, thyroid hormones and sex steroids play around the seasons

Light duration over 24 h (i.e. photoperiod) varies throughout the year, notably in higher latitudes, and this seasonal change in the day/ night ratio impacts the daily pattern of SCN activities. Thus, the SCN exhibits seasonal/photoperiodic changes in clock gene expression, electrical activity, neuropeptide synthesis, and clock outputs (Coomans et al., 2015; Hazlerigg et al., 2005; Mrugala et al., 2000; Tournier et al., 2007; Vanderleest et al., 2007 for reviews). Consequently, several biological functions also exhibit seasonal rhythms, which are crucial for species adaptation in the wild. To escape harsh environmental conditions or benefit from particularly advantageous ones, species exhibit a large panel of adaptive behavioral and biological seasonal rhythms such as hibernation, migration, adjustment in food intake and body weight, or change in fur color. Many mammals also display seasonal variations in reproduction and many related hormones such as sex steroids, prolactin, and thyroid hormones (Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Helfer et al., 2019 for reviews). In humans, the issue of seasonality has long been debated because the human population has freed itself from environmental constraints (Bronson, 2004). However, early neuroanatomical studies reported that the number of SCN AVPand VIP-containing neurons is increased in late spring/early summer (Hofman and Swaab, 1993). Moreover, recent studies have demonstrated that the transcriptome (Dopico et al., 2015), cognitive functions (Meyer et al., 2016), and a large number of circulating hormones (Tendler et al., 2021) exhibit marked seasonal fluctuation in humans.

Melatonin, a hormone produced by the pineal gland under the control of the SCN plays a pivotal role in the seasonal synchronization of biological functions in mammals (Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Simonneaux and Ribelayga, 2003). Briefly, the SCN conveys photoperiodic information to the pineal gland via a polysynaptic efferent pathway running via the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord, the superior cervical ganglia whose noradrenergic fibers innervate the pineal gland. This SCN-driven pathway results in a nocturnal release of norepinephrine, which induces a β-adrenergic cAMP-dependent increase in aralkylamine N-acetyltransferase (AANAT), the rate limiting enzyme for melatonin synthesis. As the newly synthesized melatonin is readily released by the pinealocytes, this results in a nocturnal peak of circulating melatonin, which is observed in all mammals whether exhibiting a nocturnal or diurnal physiology. The photoperiodic regulation of the SCN-driven noradrenergic pineal input results in a photoperiodic modulation of melatonin production, with a longer, and in some species a higher, nocturnal melatonin peak in long winter nights (short days) as compared to short summer nights (long days). Thus, the temporal pattern of melatonin serves as an endocrine signal conveying photoperiodic, and therefore seasonal, information to the whole organism (Fig. 1). Melatonin acts principally through the MT1 and MT2 receptors coupled to G_i protein and to a less extent to Gq/11 protein (Jockers et al., 2016 for review; Reppert et al., 1994, 1995). These receptors are located widely throughout the body in various peripheral organs and brain areas, including the SCN, although with speciesspecific differences (Klosen et al., 2019; Masson-Pevet et al., 1994). Yet, in all mammalian species investigated so far, melatonin binds at a very high density on the thyrotroph cells of the pars tuberalis, the rostral part of the adenohypophysis extending along the ventral aspect of the median eminence (Vaněcek et al., 1987), indicating that this endocrine structure is essential for the physiological role of melatonin. Melatonin exhibits a chronobiotic effect on daily functions when applied at a specific time of the day (Redman et al., 1983) but pinealectomy has limited effects on daily functions (Cheung and McCormack, 1982). By contrast, early experiments of pineal lesion demonstrated that this hormone plays a major role in seasonal functions. Indeed, pinealectomy fully prevents the short-day induced inhibition of reproductive activity in Syrian hamsters (Hoffman and Reiter, 1965; Reiter 1980 for review). Further studies using timed infusion of melatonin confirmed the pivotal role of the melatonin peak duration in synchronizing not only breeding activity but also other biological functions exhibiting seasonal changes such as body weight regulation or change in fur color (Bartness et al., 1993; Morgan et al., 2006 for reviews). An appropriate seasonal synchronization of breeding activity is essential to enable offspring's birth and weaning to occur at the spring season when warm temperature and food abundance maximize their survival. Species like rodents, with a few week-gestation, breed in spring/early summer while most of larger mammals like sheep, goat, deer, with a few month-gestation, breed in fall/winter. Yet, whether seasonal mammals are long-day or short-day breeders, they all use the melatonin calendar to time their breeding activity. Recent studies have demonstrated that in both types of seasonal breeders, the pars tuberalis MT1 is the pivotal site where the endocrine melatonin signal is decoded to modulate seasonal biological functions through downstream hormonal signals, notably thyroid and sex steroid hormones. Indeed, the pineal, thyroid and gonad glands have long been known essential for seasonal breeding in mammals, but only recent neuroanatomical, physiological and genome-wide analyses revealed the functional link between melatonin, triiodothyronine (T3), and sex steroids for timing reproduction with the seasons (Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Helfer et al., 2019; Nakane and Yoshimura, 2014; Yoshimura, 2013 for reviews). In summary, in longday conditions, the pars tuberalis thyrotroph cells synthesize thyroidstimulating hormone (TSH) which binds TSH receptors located in the tanycytes, ependymal cells located along the basal wall of the third ventricle, to activate type 2 deiodinase (Dio2, which converts the thyroxine (T4) into the bioactive T3) and inhibit type 3 deiodinase (Dio3, which inactivates thyroid hormones), resulting in high local T3 concentration. In short-day conditions, by contrast, the long melatonin peak inhibits TSH synthesis, leading to a reversed Dio2/Dio3 ratio and reduced local T3. This melatonin-driven TSH-induced switch in Dio2/ Dio3 leads to higher levels of intra-hypothalamic T3 in summer longdays as compared to winter short-days, in all seasonal species whether they are long- or short-day breeders (Fig. 1). In seasonal rodents, intracerebral administration of TSH or T3 in short-day adapted animals prevents the inhibition of reproductive activity (as well as the loss in body weight and the occurrence of torpor bouts), therefore preserving their long-day phenotype despite the photo-inhibitory conditions (Barrett et al., 2007; Klosen et al., 2013; Murphy et al., 2012). Similarly, T4 microimplants in the premammillary and preoptic areas in thyroidectomized ewes enable the onset of seasonal anestrus (Anderson et al., 2003). The melatonin-driven change in intra-hypothalamic T3 is now considered as a hallmark of seasonality in mammals, yet the downstream mechanisms by which hypothalamic T3 regulates seasonal reproduction are still not fully understood. Of note, in non-mammalian vertebrates, notably birds, melatonin is a weaker seasonal signal as light length plays a direct, melatonin-independent effect on breeding activity (Benoit, 1964). Recent studies, notably in quail, have demonstrated that seasonal changes in light act via deep-brain photoreceptors to regulate the pars tuberalis TSH/hypothalamic T3 signal which, similarly to mammals, synchronizes seasonal reproduction (Nakane et al., 2010; Nakane and Yoshimura, 2014 for review; Nakao et al., 2008; Yoshimura

et al., 2003).

1.4. Reproduction around the clock and seasons

Reproduction exhibits marked daily and seasonal rhythms in order to adapt breeding activity to environmental challenges. It is therefore fundamental to understand how geophysical signals are integrated into the hypothalamo-pituitary-gonadal (HPG) axis. This functional axis classically encompasses preoptic neurons whose nerve projections end in the median eminence area to release gonadotropin-releasing hormone (GnRH), which stimulates the production of pituitary luteinizing (LH) and folliculo-stimulating (FSH) hormones, which further downregulate gonadal growth and activity (Herbison, 2015 for review). GnRH is usually released in a pulsatile manner, but at a specific time window in females, it is released as a surge that induces a large and transitory increase in LH, which is required to trigger ovulation. In the early 2000's, two hypothalamic neuropeptides belonging to the same family of (Arg) (Phe)-amide peptides, kisspeptin and the (Arg)(Phe)-related peptide-3 (RFRP-3), were discovered to operate upstream of GnRH neurons to regulate reproduction (Pinilla et al., 2012; Ubuka et al., 2016 for reviews). Kisspeptin neurons are located in two hypothalamic areas, the anteroventral-periventricular (AVPV)/preoptic area and the arcuate nucleus (ARC), and project mainly to the GnRH cell bodies and nerve endings, respectively (Yip et al., 2015). Kisspeptin is critical for reproductive activity since a null mutation in the gene encoding its receptor Kiss1R abolishes puberty onset (de Roux et al., 2003, Seminara et al., 2003), and in all mammalian species investigated so far, kisspeptin powerfully activates GnRH neurons (Gottsch et al., 2004; Messager et al., 2005; Thompson et al., 2004). Furthermore, kisspeptin neurons are the main site where sex steroids exert their feedback since kisspeptin expression is either inhibited, in the ARC, or activated, in the AVPV/ preoptic area, by a direct effect of estrogens and testosterone (Smith et al., 2005a,b). RFRP-3 neurons are located in the dorso/ventromedial hypothalamus and project to various extra- and intra-hypothalamic areas, notably GnRH and kisspeptin neurons (Kriegsfeld et al., 2006; Poling et al., 2013). Various studies have reported that RFRP-3 regulates GnRH neuronal activity and gonadotropin secretion, but its effect is variable according to species, sex, and environmental conditions (Ancel et al., 2012; Anderson et al., 2009; Ducret et al., 2009; Henningsen et al., 2017; Pineda et al., 2010; Ubuka et al., 2012). The role of RFRP-3 neurons in mediating the sex steroid feedback in the brain is debated and may depend on species (Henningsen et al., 2017; Lomet et al., 2020; Poling et al., 2013; Quennell et al., 2010; Revel et al., 2008), and a recent study indicates that they are involved in the inhibitory effect of stress on reproduction (Kirby et al., 2009). Notably, an increasing number of studies now indicate that both kisspeptin and RFRP-3 neurons, rather than GnRH neurons, are the neuronal substrates where daily and seasonal cues are integrated and forwarded to the reproductive axis (Angelopoulou et al., 2019; Simonneaux, 2020 for reviews).

In female mammals, previous studies have established that a functional circadian system is required for the timing of the GnRH-induced preovulatory LH surge at the resting/active period transition and for optimal fertility. Thus, SCN lesion (Brown-Grant and Raisman, 1977) or Clock gene mutation (Miller et al., 2004) result in altered LH surge, estrous cyclicity, and reproductive success. In women as well, a singlenucleotide polymorphism in Bmal1 is associated with more miscarriages and altered pregnancies (Kovanen et al., 2010). Current studies indicate that kisspeptin neurons, and to a lesser extent RFRP-3 neurons, play a pivotal role in the transmission of the daily signal to GnRH neurons. Indeed, AVPV kisspeptin neurons receive a direct SCN AVP neuronal input (Vida et al., 2010; Williams et al., 2011) which increases their activity at the rest/activity (light/dark in nocturnal rodents) transition, but only under a positive estrogen feedback (Adachi et al., 2007; Piet et al., 2015; Robertson et al., 2009; Williams et al., 2011). Thus, at the end of the follicular phase, high circulating estrogens produced by mature oocytes increase AVPV kisspeptin synthesis and

allow the daily AVP input to induce kisspeptin release which in turn triggers the preovulatory GnRH/LH surge (Adachi et al., 2007; Chassard et al., 2015; Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2006). Besides, RFRP-3 neurons receive SCN AVP and VIP inputs (Angelopoulou et al., 2021; Russo et al., 2015), and their activity is decreased at the light/day transition in an estrogen-independent manner (Angelopoulou et al., 2021; Gibson et al., 2008). Since RFRP-3 decreases the LH surge amplitude, it is proposed that the reduced RFRP-3 inhibitory input allows a full kisspeptin-induced preovulatory GnRH/LH surge at the light/dark transition (Henningsen et al., 2017). Altogether, these data indicate that the SCN-driven opposing activation of kisspeptin neurons and inhibition of RFRP-3 neurons synchronize the preovulatory LH surge at the early active period when arousal is maximal.

Regarding the central regulation of seasonal breeding, early studies indicated that GnRH neurons may not be the direct target of the melatonin/T3 signal as there is no seasonal variation in the number of GnRH neurons and the level of GnRH-immunoreactivity (Urbanski et al., 1991). Rather, recent data have highlighted the role of kisspeptin neurons in the ARC and RFRP-3 neurons in seasonal breeding. Indeed, in seasonal rodents, the long short-day melatonin peak inhibits the synthesis of RFRP-3 and ARC kisspeptin, with the effect on kisspeptin being strongly modulated by the negative sex steroid feedback (Ansel et al., 2010; Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2006; Revel et al., 2008). This melatonin-driven regulation of the RF-amide peptides is thought to involve the TSH/T3 signaling since central administration of TSH or T3 in short-day adapted hamsters restores the long-day phenotype of kisspeptin and RFRP-3 neurons (Henson et al., 2013; Klosen et al., 2013) and a mutation of the α subtype of thyroid hormone receptor (TR α) prevents the melatonin-inhibition of RFRP-3 (Ouignon et al., 2020). Of note, in seasonal short-day breeders like sheep, the long short-day melatonin peak is also associated with lower levels of RFRP-3, but to higher levels of ARC kisspeptin (Lomet et al., 2020). Furthermore, in some seasonal species, a chronic infusion of kisspeptin, or to a lesser extent RFRP-3, in photo-inhibited animals has been reported to restore gonadal activity (Ancel et al., 2012; Caraty et al., 2007; Cazarez-Marquez et al., 2019; Henningsen et al., 2016; Revel et al., 2006). Altogether, these findings suggest that the melatonin-driven seasonal change in intrahypothalamic T3 is integrated by both RFRP-3 and kisspeptin neurons to adjust breeding activity with the seasons.

1.5. Environmental disruption of the rhythms of life

A temporal harmony between astronomical cyles and biological rhythms is critical for the "One Health" concept which includes individual, species, and environmental health issues. However, in contemporary life, organisms are exposed to increasing environmental disturbances, notably light pollution (such as work in shifted schedule, nocturnal artificial lighting, blue light screen exposure) and endocrinedisrupting chemicals (EDCs) (in food, air and water, plastics, household products, medicines) which may have detrimental effects on the photoneuroendocrine pathways regulating biological rhythms (Bedrosian et al., 2016). Indeed, short light exposure at an unexpected time of the night can induce a phase shift of the SCN clock and a constant exposure to light can desynchronize the SCN clock, all events leading to altered downstream biological functions (Golombek and Rosenstein, 2010 for review). An increasing number of studies also report that EDCs impact thyroid hormones (Gutleb et al., 2016 for review) and sex steroid hormones (Amir et al., 2021 for review), which play an essential role in biological rhythms. Therefore, the objective of this review is to assess the potential negative effects of light pollution and EDCs on daily and seasonal rhythms, notably those associated with reproduction.

2. Light pollution impairs reproductive rhythms

2.1. Artificial light at night and disrupted light/dark cycles

Since the design of electric bulbs in 1879, the rapid demographic and economic development has contributed to a massive increase in artificial light exposure leading to the current concept of light pollution. Light pollution corresponds to the excessive amount of artificial light to which living beings are exposed at inappropriate timing (mostly during the night). As light is the principal synchronizer of the circadian and seasonal timing systems, exposure to light pollution is a major risk of biological rhythm disruption.

Nowadays, most business sectors such as healthcare, transport, industrial activity, and even leisure require around-the-clock activity. The modern 24/7 society has extended the period of human activity, and today between 15% and 30% of the European and American workers are employed in non-standard work schedules (Boivin and Boudreau, 2014). Shift work is defined by the International Labour Office as "a method of organization of working time in which workers succeed on another at the workplace so that the establishment can operate longer than the hours of work of individual workers" during both day and nighttime (ILO, 1990). Standard daylight working hours and the design of shift work arrangements differ according to the legal and institutional framework of countries. Usually, most shift work schedules are organized in two 12-hours shifts or three 8-hours shifts (morning/first shift, afternoon-evening/second shift, or night/third shift) in a permanent or rotating manner, sometimes followed by several days off. It is now well established that light/dark cycles disruption during shift work is associated with a higher risk of sleep and mood disorders, metabolic and cardiovascular diseases, cancers, and reduced fertility (Deng et al., 2018; Kecklund and Axelsson, 2016; Yaw et al., 2020 for reviews).

Furthermore, exposure to artificial light at night (ALAN) is developing with nowadays >80% of the world population living under a lightpolluted sky (Cinzano and Falchi, 2020; Falchi et al., 2016; Kyba et al., 2017). ALAN may induce circadian disruption according to the level, spectrum, and distribution of light, as well as the timing and duration of exposure (Lunn et al., 2017). Moreover, ALAN exposure interferes with photoperiodic cues and induces a mismatch between seasonal environmental conditions and physiologic adaptations, which may potentially lead to an inappropriate breeding period (Walker et al., 2019).

The decline in fertility is becoming a global public health concern. Circadian disruption and inappropriate light exposure induced by the pace of modern life can impair the rhythms in reproductive activity and consequently increase difficulty in conceiving a child. Therefore, it is relevant to explore the impact of shifts in light/dark cycles and exposure to ALAN on human and animal reproductive rhythms.

2.2. Impact of disrupted light/dark cycles on daily rhythms in reproduction

2.2.1. Rotating/night shift work impairs reproduction in humans

The circadian timing system, located at each level of the HPG axis, orchestrates sperm production and maturation, follicular development, the timing of the preovulatory LH surge, fertilization, the timing of implantation, pregnancy, labor, delivery, and lactation (Boden et al., 2013 for review). Many epidemiological studies have demonstrated that the desynchronization of endogenous circadian clocks by shift work impairs human reproduction and fertility (Fig. 2).

In women, nocturnal light exposure (night shift work) and disrupted sleep/wake cycles (rotating shift work) are associated with impaired hormonal secretion, altered length and regularity of menstrual cycles, reduced fertility, increased risk of early or late miscarriage, preterm



Fig. 2. Disrupted light/dark cycles impair various reproductive parameters leading to a decrease in fertility in both humans and animal models. Depending on the sex and age of individuals, and especially of the shift schedule, disrupted light/dark cycles impair several biological functions, including various aspects of the reproductive function leading to a decreased fertility, in both humans and animal models. Stress, metabolic and reproductive axes present a close relationship and therefore influence each other. *LH*, *luteinizing hormone*.

birth, and low infant birth weight (Gamble et al., 2013; Yaw et al., 2020 for reviews).

One of the first symptoms indicating a reproductive dysfunction is abnormal menstrual cyclicity, often combined with anovulatory cycles and consequent subfertility. A cohort study including 71 077 US reproductive-aged female nurses has demonstrated that rotating shift work is associated with an increased probability of having irregular menstrual cycles (>7 days variability) and altered menstrual cycle duration, being either shortened (<21 days) or lengthened (>40 days). This study also reported that the risk is increased with the time spent on rotating shift work (>20 months), which suggests a cumulative negative impact of chronodisruption on women's fertility (Lawson et al., 2011). Other studies conducted on a smaller number of women reached the same conclusion. Thus, a study reported that women working on 12hours rotating shifts in Taiwanese high-tech industries have altered menstrual cycle length (<25 or > 35 days) (Su et al., 2008), and night shift work in Chinese (Wang et al., 2016) and Taiwanese (Chung et al., 2005) nurses is associated with short menstrual cycles (<25 days). Additionally, altered metabolic functions and increased stress associated with working conditions could indirectly affect reproductive cycles. Indeed, in their cohort study, Lawson et al. (2011) found a correlation between menstrual cycle outcomes and self-reported body mass index, and Wan and Chung (2012) reported a high prevalence of irregular ovarian cycles in nurses working in stressful emergency departments.

Studies have also reported that shift work impairs reproductive hormone secretion. In rotating/night shift workers, FSH and LH levels are higher during daytime sleep and nighttime work relative to nighttime sleep (Davis et al., 2012). Additionally, estrogen (Bracci et al., 2014; Gomez-Acebo et al., 2015), progesterone (Gomez-Acebo et al., 2015; Papantoniou et al., 2015), and androgen (Papantoniou et al., 2015) concentrations are increased in the blood and urine of shift workers. Independently of shift work, intermittent or continuous light at night can suppress melatonin and increase cortisol secretions in both men and women (Rahman et al., 2019b). Therefore, it is not surprising that several studies have reported that the nighttime urine melatonin level is lower in rotating/night shift workers as compared to day workers (Davis et al., 2012; Gomez-Acebo et al., 2015; Papantoniou et al., 2015; Razavi et al., 2019). Although the role of melatonin within the HPG axis in humans is not fully understood, some in vitro studies (Bódis et al., 2001; Cheng et al., 2020; Woo et al., 2001) suggest a potential involvement of melatonin in the regulation of human ovarian function. Thus, the decrease in melatonin secretion might be associated with altered sex steroid concentrations observed in women under disrupted light/dark cycles.

Regarding pregnancy outcomes, a recent systematic review including a *meta*-analysis of 62 studies reported that rotating and/or night shift work is associated with increased risks of miscarriage (23% for night shifts), preterm birth (13% for rotating shifts and 21% for night shifts), small for gestational age newborns (18% for rotating shifts), and low birth weight newborns (Cai et al., 2019). Although a strong correlation was found between shift work and adverse pregnancy outcomes, the authors of this review highlighted some methodology bias. Notably, the various epidemiological studies may have different definitions of rotating/night shift work and have included different variables which can influence the organization of working time and the pregnancy follow-up (Cai et al., 2019; Fernandez et al., 2016b).

Shift work conditions can also affect reproductive aging. A cohort study including 80 840 US nurses has shown that chronic (10–20 years) rotating/night shift work increases the risk of early menopause as compared to permanent shift work (Stock et al., 2019; Stock and Schernhammer, 2019 for review). Furthermore, endometriosis (Marino et al., 2009), polycystic ovarian syndrome (PCOS) (Wang et al., 2021a), as well as breast (Schernhammer et al., 2001), ovarian (Bhatti et al., 2013; Carter et al., 2014; Poole et al., 2011), and endometrial (Viswanathan et al., 2007) cancers, can also be associated with shift work conditions.

In men, the reproductive consequences of circadian rhythm disruption are less studied than in women. However, epidemiological studies have reported a link between rotating/night shift work and male reproductive disorders such as erectile dysfunction, deterioration of sperm quality parameters, and reduced fertility (Deng et al., 2018 for review). Sleep disorders are associated with erectile dysfunction, and because 20% of shift workers are affected by sleep troubles (Deng et al., 2018 for review), the prevalence is increased in men working at night (Rodriguez et al., 2020). In a cohort study of 1 346 reproductive-aged Chinese men, the proportion of men with a low total sperm count was higher in rotating night shift workers than in day workers and permanent shift workers (Liu et al. 2020). Furthermore, another study, based on 54 734 men from 35 European countries followed between 2000 and 2015, concluded that rotating shift work, but not permanent shift work, affects men's fertility rates (He et al., 2021). As the women's studies indicate, the consequences of shift work depend on the shift schedule and its association or not with poor sleep quality. In addition, acute exposure to the light of electronic device screens (smartphone, tablet, or television) at night is associated with a decrease in sperm motility and concentration (Green et al., 2020).

Assessing the effect of circadian rhythm disruption in humans is complex because the rotating/night shift arrangements, as well as the sex and age of shift workers, differ among studies. Furthermore, there are several confounding factors associated with rotating/night shift work such as disrupted sleep/wake cycles, metabolic disorders, altered social interactions, and mental workload (Kecklund and Axelsson, 2016). These factors are important to consider when assessing the reproductive effects of shift work because a close relationship between metabolic, stress, and reproductive axes is well established. In this context, modeling shift work in experimental animals may help to better understand the exact effects of chronodisruption on reproductive activity and further analyze the underlying mechanisms.

2.2.2. Animal models to investigate the effect of circadian disruption on reproduction

The effects of constant light or darkness on female rodent reproduction have long been investigated (Fiske, 1941). More recently, shift work has been modeled experimentally, with animals exposed to shifting light/dark cycles with phase advance or phase delay, or both phase advance and delay (rotating shifts) of various periods, during different duration (several days, weeks, or months). While numerous animal studies have investigated how various circadian disruptions alter metabolic functions, only a few have evaluated the effects of light/dark cycle disruption on the HPG axis, and none investigated the neuroendocrine mechanisms involved in such effects.

In female rodents, different protocols of circadian disruption have reported detrimental effects on reproductive parameters. An early study reported that lengthening the light period at the beginning of the day advances ovulation by 2 h, whereas lengthening the light period at the end of the day delays ovulation by 5 h (McCormack, 1975). The chronic reversal of light-dark cycles also lengthens the period of estrous cycles which remains irregular for >4 weeks after the mice were returned to regular light-dark cycles (Yoshinaka et al., 2017). As mentioned previously, the preovulatory LH surge in nocturnal rodents is synchronized with the resting (light)/active (dark) period transition of the day of proestrus, as the result of both the positive estrogen feedback and the SCN circadian signal. Early studies carried out in female Syrian hamsters have reported changes in the LH surge occurrence following daily rhythm modifications. Thus, hamsters exposed for 3 weeks to different photoperiod lengths (6L/18D; 14L/10D; 18L/6D; 22L/2D) presented a close relationship between the delays of both LH surge and locomotor activity onset (Moline et al., 1981). These results demonstrate the tight connection between the light environment, the circadian timing system, and biological functions. In another study, hamster's exposure to 3-hour phase advance or 3-hour phase delay of light/dark cycles for 1, 2 or 3 days before the proestrus, lead to an altered amplitude and delay of the

LH surge depending on the length and direction of the shift (Moline and Albers, 1988). Interestingly in this study, the synchronization of the preovulatory LH surge as well as the locomotor activity onset with the light/dark cycles were faster in phase delay condition than in phase advance condition. More recently, Bahougne et al. (2020) investigated the effects of different light/dark cycle disruptions on the LH surge timing and fertility in female mice. When mice were exposed to a single 10-hour phase advance or phase delay, they showed either no LH surge or an advanced LH surge, associated with irregular cycles, during the first and second estrus cycles after the shift. However, from the third estrous cycle, mice recovered a correct LH surge timing and regular estrous cycles. In contrast, chronic exposure to disrupted light/dark cycles, mimicking a rotating/night shift work, had much more negative consequences on their reproductive parameters. Thus, mice exposed to cycles of a 10-hour phase advance for 3 days followed by a 10-hour phase delay for 4 days became acyclic and exhibited no more LH surge soon after the beginning of the chronic shift. Moreover, female mice exposed to this chronic shift for 4 weeks were less fertile as illustrated by a lower gestation rate and a reduced litter as compared to mice kept in regular light/dark cycle. This study indicates that in female rodents, the precise timing of ovulation at late-proestrus, driven by an LH surge set at the transition between the resting and active periods, is critical to ensure optimal fertility. Further, as observed in humans, chronic exposure to rotating shift is the most deleteriousschedule on reproductive activity.

The effect of disrupted light/dark cycles has also been explored on gestation. Thus, mice exposed from the beginning of their gestation to a chronic 6-hour phase advance or a chronic 6-hour phase delay every 5–6 days have a higher risk of not carrying a gestation to term, with a greater negative impact for the phase advance compared to the phase delay, although with no effect on the litter size (Summa et al., 2012). Interestingly, exposure to chronic shifted light/dark cycles (6-hour phase advance every 4 days) does not impair mouse uterine receptivity and gestation success after embryo transfer, which suggests that the disruption of reproductive functions occurs upstream of uterus activity (Goldstein et al., 2018). In ewes, a chronic shift during pregnancy also impairs maternal metabolic function and pregnancy outcomes (gestational length and birth weight) (Gatford et al., 2019).

One study reported that circadian disruption also alters male mouse reproductive functions. Male mice exposed to 4-hour light/4-hour dark cycles for 10 weeks exhibited a reduced serum level of GnRH, dihydrotestosterone as well as androstenedione, a decreased sperm concentration (nearly 30%) and motility, and a temporarily reduced testosterone secretion (after 5 weeks of exposure but not at the end of the shift protocol). Moreover, the food intake and body weight of the male mice were significantly higher after circadian disruption, suggesting an alteration of the metabolic function as well. Finally, females mated with males exposed to this shortened light/dark schedule exhibited a low birth rate, reduced litter size, and low pups' body weight (Xu et al., 2020).

In animals, like in humans, exposure to chronic disruption of the light/dark cycles (mimicking shift work conditions) impairs various aspects of the reproductive function with different intensities depending on the lighting schedule (Fig. 2). Therefore, animal models of shift work may be used to study the so far under-investigated neuroendocrine mechanisms involved in the effect of circadian disruption on the male and female HPG axis.

2.2.3. Potential neuroendocrine mechanisms involved in the circadian disruption of reproduction

Studies using mice with systemic or organ-specific clock gene deletions have highlighted the role of central and peripheral circadian clocks in the regulation of female reproductive rhythms (Sciarra et al., 2020; Sen and Hoffmann, 2020; Simonneaux and Bahougne, 2015 for reviews). As mentioned previously, circadian clocks are found in various extra-SCN central structures and peripheral organs, including those constituting the HPG axis.

In female rodents, many brain structures and organs involved in reproduction host a circadian clock. The AVPV kisspeptin neurons (Chassard et al., 2015) and the GnRH neurons (Hickok and Tischkau, 2010) display daily rhythms of clock gene expression, which are sensitive to estradiol for the former. The pituitary gland also exhibits daily oscillations of clock genes, but *Bmal1* specific deletion in the gonado-tropic cells has minor effects on FSH and LH secretion (Chu et al., 2013). In the ovaries, granulosa cells, theca cells, and oocytes host a molecular clockwork, and this circadian timing system is thought to regulate theca cells' sensitivity to LH, steroidogenesis, and ovarian follicles development (Fahrenkrug et al., 2006; Gras et al., 2012; Karman and Tischkau, 2006). Finally, circadian rhythms of clock genes are observed in the fallopian tubes and endometrial tissues, which are thought to control peristaltic action, implantation, and maintenance of pregnancy (Sen and Hoffmann, 2020; Sen and Sellix, 2016 for reviews).

In male mammals, the contribution of the circadian timing system for proper reproductive activity appears minor, although the timing of hormone release is important for sperm maturation (Bittman, 2016 for review). Extra-testicular ducts and accessory organs of mouse testis show daily rhythms of clock genes expression (Bebas et al., 2009). The rhythmic expression of *Bmal1* is required for testosterone production in Leydig cells (Alvarez et al., 2008), and may involve an LH-dependent synchronization by the SCN (Baburski et al., 2019). However, the clock genes *Per1* and *Clock* have a non-circadian role in mouse testis where they are expressed only at specific stages of spermatogenesis (Alvarez et al., 2003; Bittman et al., 2003; Morse et al., 2003).

Further experimental studies in animal models are required to disclose the neuroendocrine mechanisms involved in the circadian disruption of reproductive rhythms, and notably to assess how alteration in SCN circadian activities impairs the HPG axis. Circadian chronodisruption may modify the rhythms in SCN AVP and VIP outputs towards the GnRH neurons population directly or indirectly via the kisspeptin and/or RFRP-3 neurons, which in turn could result in an altered timing of gonadotropin secretion leading to impaired gonadal activities. This hypothesis is supported by a study reporting that female mice deficient in VIP have weakened SCN oscillations and exhibit disrupted estrous cycles and ovulation (Loh et al., 2014). The disrupted master SCN clock could also desynchronize the peripheral HPG clocks whose coordinated rhythmicity is required for the proper timing of reproductive hormone secretion and gonadal activity. Additionally, the decreased nocturnal melatonin production associated with rotating/ night shift work (Davis et al., 2012; Gomez-Acebo et al., 2015; Papantoniou et al., 2015; Razavi et al., 2019) may also be involved in reproductive disorders, as melatonin has been reported to modulate sex steroid synthesis by the ovaries and consequently affect the timing of the sex steroids feedback. Finally, exposure to chronodisruption during pregnancy may induce epigenetic modifications, such as DNA methylation, in the mother's and offspring's genome resulting in altered offspring development and reproductive health later in life (Sati, 2020 for review).

Even though experimental and mechanistic studies are required to understand the negative impact of circadian disruption on reproduction, caution should be taken not to over-extrapolate the results from animals to humans. Indeed, as discussed by Yaw et al. (2020), most animal models used in chronobiology studies are nocturnal while humans are diurnal, and one of the most common rodent models is the melatonin deficient C57BL/6J mouse strain, which does not allow to assess the chronodisruptive effect of reduced melatonin. Moreover, there are also notable differences between human and rodent reproductive parameters such as the duration of ovarian cycles, or gestation. Nevertheless, the use of diurnal models should help to better understand the impact of sleep/ wake cycle disruption on human reproduction, while the use of nocturnal models may help to assess the effect of light during the night, independently of sleep disturbance. Studies in various animal models can provide an interesting approach to determine whether shift workrelated health issues, are due to circadian disruption alone or associated with sleep disorders (Borniger et al., 2013).

Finally, if chronodisruption has been mostly studied in the context of shifting light/dark cycles, chronic effects of the urban lighting/light screen exposure at night have not been studied on human reproduction, although many studies indicate that ALAN can disrupt the timing of animal reproduction.

2.3. Impact of artificial light pollution at night on seasonal reproduction

Because ALAN mainly interferes with the interpretation of natural photoperiodic cues, its impact is increasingly studied in seasonal species for which photoperiodic cues are critical for reproductive success.

2.3.1. Photoperiod is the main synchronizer for seasonal reproduction

Early studies have shown that a disruption in the retino-SCN-pineal gland pathway inhibits gonadal response to light and photoperiodic cues (Hoffman and Reiter, 1965; Rusak and Morin, 1976; Stetson and Watson-Whitmyre, 1976). Notably, an early study reported that male Syrian hamster enucleation or exposure to only one hour of light per day results in testicular regression unless the pineal gland has been previously removed (Hoffman and Reiter, 1965). This study suggested that in spring/summer breeders, like small rodents, a long nocturnal melatonin release is requested to repress gonadal activity, while a long period of light or light at night prevents this melatonin-induced inhibition of reproduction (Hoffman and Reiter, 1965).

Photoperiod manipulation in laboratories has established that a photoperiod of at least 12.5 h of light per day, called the critical photoperiod, is necessary to maintain the Syrian hamster's testicular activity (Gaston and Menaker, 1967). However, the value of critical photoperiod is flexible as it depends on species but also on photoperiod history, i.e. whether photoperiod is shortening or lengthening (Ebenhöh and Hazlerigg, 2013; Gorman et al., 1997; Petri et al., 2016). In controlled laboratory conditions, animals kept for a few weeks under a photoperiod inferior to their critical photoperiod (short photoperiod (SP) of usually 8-10 h of light per 24 h) is sufficient to trigger a winter/ autumn like reproductive phenotype while animals kept in a photoperiod superior to their critical photoperiod (long photoperiod (LP) of 14-16 h of light per 24 h) induces a summer/spring-like reproductive phenotype. Therefore, in most seasonal species, changing photoperiod length, with no other changes in temperature or food availability, is sufficient to activate/inhibit the reproductive status, thereby demonstrating the role of light and melatonin in synchronizing seasonal reproduction (Dardente, 2012; Gaston and Menaker, 1967; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Hoffman and Reiter, 1965; Nakane and Yoshimura, 2019). Additionally, most seasonal species have internal timers that allow them to escape the environmental photoperiod. Some species, kept for several weeks in photo-inhibitory conditions, become refractory to the inhibiting photoperiod and exhibit spontaneous activation of reproduction (Dawson and Sharp, 2007; Karsch et al., 1986; Milesi et al., 2017). Other species have a circannual clock that drives endogenous seasonal cycles independently of melatonin (Sáenz de Miera et al., 2014). However, in both cases, light exposure can modulate these internal timers (Sáenz de Miera et al., 2018).

2.3.2. Reproductive consequences of short pulse of light or continuous dim light at night

As photoperiod is directly related to the reproductive status, species need to acutely time photoperiod by detecting light signals, a mechanism called photoperiodic time measurement. Studies have shown that a continuous light signal is not mandatory for photoperiodic time measurement, as short pulses of light are sufficient to trigger neuroendocrine responses (Hastings et al., 1985; Simonneaux and Ribelayga, 2003 for review). Thus, animals exposed to two light events separated by a dark period corresponding to a long-day exposure (14–16 h for example) exhibit a LP reproductive phenotype similar to the one observed if they were exposed to continuous LP conditions (Hastings et al., 1985). This effect of light pulses is due to a phase relationship between the circadian system and periods of photosensitivity. Indeed, a light pulse, even as short as 1 min, given at nighttime during the photosensitive window of animals kept in SP condition, can induce a LP phenotype in the Siberian hamster (Hoffmann, 1979), mink (Boissin-Agasse et al., 1982), sheep (Ravault et al., 1988), and Syrian hamster (Hastings et al., 1985).

In addition, light pulse exposure at night rapidly decreases AANAT activity and melatonin synthesis in the pineal gland which can lead to a misreading of the photoperiodic cues used to synchronize seasonal reproduction (Drijfhout et al., 1996; Illnerova et al., 1978, 1979; Illnerová and Vaněček, 1985; Klein and Weller, 1972). Only 1 min of light exposure is sufficient to decrease AANAT activity and melatonin synthesis, and 5 min of light exposure induces a complete inhibition of the enzyme activity and melatonin synthesis, which persists for a few hours after the return to darkness (Drijfhout et al., 1996; Illnerova et al., 1979). Therefore, if the light pulse occurs during the first part of the night, the inhibition of melatonin synthesis is reversible, while if it occurs during the second part of the night, melatonin synthesis is inhibited for the rest of the night (Illnerová and Vaněcek, 1985). Interestingly, Vaněček and Illnerová (1982) found that the light-induced inhibition of AANAT depends on the intensity and duration of the light pulse. Thus, AANAT activity is inhibited by 0.1-minute exposure to 200 lx, 1-minute exposure to 0.5 to 5 lx, but requests 20-minutes exposure to a dim light (0.2 lx). Another study in Syrian hamsters showed that the threshold for white light inhibition of melatonin production lies between 1.08 and 0.11 lx (Brainard et al., 1982).

2.3.3. Reproductive consequences of nocturnal pollution by artificial light

Both field and laboratory studies report that ALAN interference with photoperiodic cues may cause a mismatch between seasonal environmental conditions and physiologic adaptations. Thus, in Siberian hamsters kept in SP conditions, exposure to 5 lx light during the night alters their SP phenotype with a lower decrease in gonadal size and body weight, and a reduced fur whitening as compared to SP control animals not exposed to light at night (Aubrecht et al., 2015; Ikeno et al., 2014). In different avian species as well, exposure to dim light at night reduces melatonin release, which may impact the timing of reproductive events such as gonad growth, breeding, and egg-laying date (de Jong et al., 2015; Dominoni et al., 2013b, 2018; Kempenaers et al., 2010; Singh et al., 2021; Zhang et al., 2014). Other studies have reported that ALAN exposure induces an advance in gonadal growth in European blackbirds (Dominoni et al., 2013b) and male dark-eved juncos (Singh et al., 2021), and in egg-laying date (de Jong et al., 2015; Kempenaers et al., 2010). In the great tit, testis size is positively correlated to the intensity of nocturnal light (Dominoni et al., 2018). Finally, a comparative study between urban and rural free-living tree sparrows showed an advanced increase in LH levels in urban birds but a higher LH peak in rural birds, a result further confirmed in a controlled photoperiod experiment (Zhang et al., 2014).

Alteration of reproductive timing by nocturnal artificial light has been reported in a large panel of species from drosophila (McLay et al., 2018), lizards (Thawley and Kolbe, 2020), marsupials (Robert et al., 2015), and primates (LeTallec et al., 2015). The study of Robert et al. (2015) reported that free-living wallabies exposed to ALAN showed a marked decrease in circulating melatonin as compared to the not exposed bush population. Interestingly, exposure to ALAN in short-day breeders induces a delay in birth timing while by contrast, it induces an advance of the breeding period in long-day breeders (Aubrecht et al., 2015; de Jong et al., 2015; Dominoni et al., 2013b; Kempenaers et al., 2010; LeTallec et al., 2015; Robert et al., 2015; Singh et al., 2021; Zhang et al., 2014). These findings support the hypothesis that ALAN inhibition of melatonin production alters the synchronization of reproductive timing with environmental cues regardless of the breeding strategy (Fig. 3).

Light at night impacts other seasonal rhythms such as migration and



Fig. 3. Artificial light at night desynchronizes the timing of seasonal reproduction. In short-day breeders like hamsters living under natural environmental light conditions (<0,1 lx), the long production of melatonin during autumn/winter nights inhibits reproductive functions and the short spring/summer melatonin production activates breeding activity. This natural synchronization allows offspring's birth at the most favorable period of the year to ensure their growth and survival during the following autumn/winter season. Artificial light at night (>0,3 lx) disrupts the autumn/ winter nocturnal melatonin production, leading to a desynchronized timing of seasonal reproduction and therefore an offspring's birth at a period unfavorable for their survival. Mel, melatonin.

metabolic activity (Ikeno et al., 2014; La Sorte and Horton, 2021; Riley et al., 2012; Russart and Nelson, 2018; Smith et al., 2021; Walker et al., 2019) but also daily rhythms of food intake, sleep/wake and locomotor activity (de Jong et al., 2017; Fonken et al., 2010; Frank et al., 2010; Gorman et al., 2006; Navara and Nelson, 2007; Nelson and Chbeir, 2018; Rumanova et al., 2020; Shuboni and Yan, 2010) and immune system functions (Aubrecht et al., 2014; Cissé et al., 2020; Durrant et al., 2020). Therefore, organisms living close to cities with ALAN undergo physiological and behavioral changes and no longer adapt to the natural cycles of environmental factors but to those imposed by urban constraints.

2.3.4. Potential mechanisms involved in ALAN effect on reproductive timing

The mechanisms by which ALAN impairs reproductive timing has been poorly studied so far. As discussed above, even a low intensity of ALAN can inhibit melatonin synthesis and therefore disrupt the seasonal signal conveyed by circulating melatonin (Brainard et al., 1982; de Jong et al., 2016; Dominoni et al., 2013a; Robert et al., 2015; Vaněček and Illnerová, 1982; Fig. 3). Considering the pivotal role of melatonin on the T3-dependent synchronization of seasonal reproduction (Dardente, 2012; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Yoshimura, 2013), ALAN may alter the hypothalamic T3 signaling to reproductive neurons. Growing evidence suggests that T3 synchronizes seasonal reproduction through the RFRP-3 and/or kisspeptin neurons operating upstream of GnRH neurons (Angelopoulou et al., 2019; Kriegsfeld et al., 2018; Simonneaux, 2020; Simonneaux et al., 2013). Thus, ALAN may impair the melatonindependent regulation of hypothalamic T3, which in turn would alter the seasonal regulation of RFRP-3 and/or kisspeptin neurons leading to a disruption of reproductive timing as observed in laboratory and field studies. This hypothesis should be tested by assessing whether the reproductive impact of ALAN exposure is associated with a seasonal alteration in the Dio2/3 ratio, RFRP-3 and kisspeptin synthesis, and GnRH/gonadotropin secretion. Additional field studies are needed to decipher how ALAN polluted environmental conditions impact the hypothalamic reproductive network that synchronizes seasonal rhythms of reproduction.

2.3.5. Desynchronization between photoperiod and advanced seasonal temperature leads to inappropriate timing of reproduction

Industrialization and demographic development result in global

warming of Earth's climate, which may add to the negative impact of light pollution on wild species' adaptation to seasonal cues. Several studies have investigated the effect of global warming on seasonal adaptations under normal photoperiodic synchronization (Inouye et al., 2000; Parmesan and Yohe, 2003; Post and Forchhammer, 2008; Radchuk et al., 2019; Reale et al., 2003; Walker et al., 2019). These studies reported that an earlier spring rise in temperature leads to an advance in flowering (Inouye et al., 2000), leafing date and breaking of leaf buds (Sparks et al., 1997), plant growing period (Reyes-Fox et al., 2014), or insects hatching and development timing (Forister and Shapiro, 2003; Gordo and Sanz, 2005; Robinet and Roques, 2010; Walker et al., 2019; Wang et al., 2021b for reviews). Because photoperiod is the main synchronizer for reproduction in animal species, the combination of advanced spring temperature with the unchanged spring photoperiod may lead to a mismatch between an earlier optimal food availability and the on-time offspring's birth. A typical example of a mismatch between offspring needs and the peak of food resources has been reported in great tits where the photoperiodic control of the egg-laying date has not changed despite the warming-induced advance in caterpillars (Visser et al., 1998). Similarly in Greenland caribou, where migration after offspring birth is usually synchronized with the resource peak of availability, an earlier increase in spring temperature results in a misalignment between an advanced plant growing season and an unchanged calf birth, leading to increased offspring mortality (Post and Forchhammer, 2008).

A mismatch between climate changes and stable photoperiodic cues creates a selective pressure on reproductive timing. Even though the temperature is not the main synchronizer of seasonal functions, studies have shown that it can still impact reproduction (Barnes and York, 1990; Caro et al., 2013; Kriegsfeld et al., 2000; Selonen et al., 2016; van Rosmalen et al., 2021). Indeed, global warming has already been reported to alter reproductive timing in several species of birds and mammals (Brown et al., 1999; Dunn and Winkler, 1999; Helm et al., 2013; Radchuk et al., 2019; Reale et al., 2003; Selonen et al., 2016), but only a few studies so far have investigated the mechanisms through which the temperature rise interferes with the photoperiodic timing of reproduction. In these studies, the temperature has been reported to alter the photoperiod-dependent regulation of Dio2/Dio3 independently of TSH (van Rosmalen et al., 2021) and to alter RFRP-3 expression (Jaroslawska et al., 2015; Rahman et al., 2019a; van Rosmalen and Hut, 2021). Thus, global warming could modulate the timing of the photoperiodic regulation of reproductive functions by acting downstream of the melatonin/TSH signal to regulate T3 hypothalamic concentration and/or RFRP-3 expression.

In summary, human activity has major ecological impacts on the biological adaptation of wild species to their environment. Notably, artificial light at night and climate changes can disrupt the seasonal synchronization of reproduction. Further studies should assess the complex relationship between selective pressure from natural and urbanized environments and organisms' adaptive response to evaluate the impact of human activity. Ecophysiological studies and data crossing by *meta*-analyses are needed to investigate the mechanisms underlying the impact of the rapid anthropological change of natural ecosystems, such as light pollution on reproductive rhythms.

3. Chemical disruption of the reproductive calendar

3.1. Endocrine-disrupting chemicals invade wildlife and humans environment

The global chemical industry has grown quickly over the past decades, releasing a myriad of chemicals into the environment. Among the 350 000 chemicals produced and used worldwide (Wang et al., 2020), only a small fraction has been tested for safety by toxicologists (McPartland et al., 2015). Recently, about a thousand of these substances have been identified as potential endocrine-active compounds, so-called endocrine-disrupting chemicals (EDCs) (Flaws et al., 2020).

EDCs are substances that interfere with any aspect of hormone action with subsequent adverse effects to humans or wildlife (Gore et al., 2015). During their entire life, humans and animals are exposed to a

wide range of EDCs via air, soil and water pollution, food consumption, consumer products use, and medical treatments. These EDCs are present in combustion products (dioxins, furans, polycyclic aromatic hydrocarbons) and industrial or domestic products such as plasticizers (phenols, phthalates), pesticides (organochlorine compounds), cosmetics (parabens), and even medicines. Thus, EDCs have contaminated all strata of the environment, leading to ubiquitous exposure to living organisms. Furthermore, EDCs are persistent in the environment, because they are continuously discharged, and because some of them, like polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides, and dioxins, do not degrade readily (Kumar et al., 2020). EDCs can use different routes to enter the organism such as ingestion, inhalation, dermal contact, the crossing of placental and blood-brain barriers. A key characteristic of EDCs is their ability to interfere with various aspects of the hormonal system, such as synthesis, transport, receptor expression, signal transduction, metabolism, and binding as receptor agonist or antagonist (Fig. 4). Recent studies also evidence epigenetic and transgenerational effects of some EDCs (La Merrill et al., 2020).

The assessment of EDCs impact on human and animal health is challenging. Indeed, these substances can have species-, sex-, dose-, tissue-, and exposure period-specific effects. They most often act at very low doses and do not obey the typical dose-response principle (Zoeller et al., 2012). They sometimes show complex synergistic interactions with hardly predictable effects. Finally, because of their ubiquitous presence, it is difficult to establish solid causal evidence between EDCs exposure and pathologies. Nevertheless, epidemiological studies have reported that exposure to certain EDCs increases the risk of reproductive disorders (Laws et al., 2021), cancers of reproductive organs (Kahn et al., 2020), metabolic pathologies (Heindel et al., 2017), and cognitive



Fig. 4. Mechanisms of action of endocrine-disrupting chemicals and examples of their effects on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. Endocrinedisrupting chemicals (EDCs) exhibit a variety of modes of action, mainly by interacting on hormone nuclear receptors as agonists or antagonists and subsequently altering gene expression. They also target membrane and blood hormone transporters, as well as hormone production and degradation systems. Each part of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis is a potential target of EDCs, notably the neuroendocrine network involving the hypothalamic kisspeptin and RFRP-3 neurons regulating GnRH neurons activity and the pituitary gonadotropic cells secreting the gonadotropins LH and FSH. EDCs exposure also alters gonadal structure and function, inducing reproductive tissue abnormalities, erroneous development of sexual characteristics, irregular ovarian cycle, and altered steroidogenesis. *EDCs, endocrine-disrupting chemicals; FSH, folliculo-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; RFRP-3, (Arg)(Phe)-related peptide-3.*

disorders (Pinson et al., 2016).

3.2. Mechanisms involved in the EDCs-induced HPG axis disruption in humans and wildlife

Wildlife studies reporting reproductive and endocrine abnormalities caused by chemicals released in the environment have played a crucial role in alerting for the toxic effects of EDCs and the need to study their impact on health. Furthermore, many experimental studies on animal models have established that all levels of the HPG axis are EDCs targets, leading to numerous investigations of EDCs mechanisms of action on the reproductive system. For the scope of the review, we will discuss specific examples of EDCs effect on reproductive disorders and HPG axis disruption in humans, wildlife, and animal models.

3.2.1. Impairment of reproductive functions

Historically, the first reproductive disorders associated with chemical exposure were observed in livestock and wildlife populations. Reports from the 1920s and 1940s indicated that farm animals exhibited abnormal fertility after eating cereals or plants enriched in natural EDCs such as mycoestrogens and phytoestrogens (Darbre, 2019). In 1962, the publication of Rachel Carson's book « Silent Spring » raised awareness of the need to study the ecological and health consequences of chemical use. In particular, the biologist accused the massive use of the pesticide dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) to cause eggshell thinning with a subsequent reproductive decline of some birds of prey in Northern America (Carson, 1962). In 1980, the accidental spill of the same chemical, its metabolites (DDD, DDE) and dicofol into Lake Apopka caused a dramatic decline in juvenile recruitment in resident alligators due to decreased egg viability and increased juvenile mortality (Woodward et al., 1993).

In humans, advanced or delayed puberty onset in boys (Cargnelutti et al., 2021 for review) and girls (Lucaccioni et al., 2020 for review) has been associated with early exposure to EDCs. A study conducted on a representative sample of US women demonstrated that women with high levels of 15 persistent organic pollutants (POPs) exhibited a 1.9–3.8 year advanced menopause as compared to women with low POPs levels (Grindler et al., 2015). Bisphenol A (BPA), initially developed as an estrogen receptor (ER) agonist, is pointed out to play a role in the development of PCOS with clear evidence from animal studies and positive correlation in women with PCOS (Konieczna et al., 2018). Epidemiological studies also point towards an association between exposure to EDCs and the development of endometriosis, low semen quality, cryptorchidism, and breast and testicular cancers (Kahn et al., 2020; Rodprasert et al., 2021; Sirohi et al., 2021).

3.2.2. Gonadal structure and functions

Gonadal impairment has been one of the most studied endpoints of EDCs-induced reproductive disruption. Indeed, early indications of EDCs deleterious effects were primarily related to the damage in gonadal structure and development of erroneous sexual characteristics (Fig. 4). A representative example is the tributyltin-induced masculinization of female bivalves and gastropods with subsequent population declines following its release into harbor waters in the 1970s (Titley-O'Neal et al., 2011). Another example is the correlation of pathological changes in the uterus of seals of the Baltic Sea with high DDT and PCBs levels (Helle et al., 1976). Finally, EDCs-induced gonadal impairment has been reported in numerous species of fish (Parks et al., 2001), Xenopus tadpoles (Hayes et al., 2002), birds (Fry and Toone, 1981), and reptiles (Guillette et al., 1994; Willingham and Crews, 1999).

3.2.3. Hormone levels and receptor interactions

EDCs have a full range of modes of action to disrupt hormonal systems, like preventing hormone binding at its receptor or altering hormone levels and hormone receptor expression (La Merrill et al., 2020; Lee et al., 2013 for review regarding the estrogen receptor system;

Fig. 4). In epidemiological and experimental studies, alteration in circulating hormone levels is often associated with EDCs exposure. A typical example is the abnormal plasma sex steroid levels found in male and female alligators living in the Lake Apopka contaminated by DDT, DDT metabolites, and dicofol (Guillette et al., 1999). Another example is the inhibitory effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the most used phthalate plasticizers, on the expression of mineralocorticoid receptors in rodent testis causing an inhibition of testosterone production by Leydig cells (Martinez-Arguelles et al., 2009). In addition, EDCs-induced differences in hormone concentrations can result from modifications in hormone synthesis or degradation (La Merrill et al., 2020). For example, some EDCs interact with aromatase involved in estrogen biosynthesis (Sanderson, 2006) or estrogen sulfotransferase involved in estrogen clearance (Kester et al., 2000).

3.2.4. Neuroendocrine network

There is growing evidence that EDCs act on several aspects of the GnRH/gonadotropin system, including the hypothalamic neuro-glial network, GnRH neuron activity, and the pituitary gonadotropic cells (Fig. 4).

GABA, glutamate, kisspeptin, and RFRP-3 inputs to GnRH neurons can be altered by BPA, PCBs, and DDT exposure, especially during early life, in various animal species (Lopez-Rodriguez et al., 2021 for review). Experimental studies investigating the sensitivity of kisspeptin neurons to EDCs have shown that BPA infusion in the median eminence of female rhesus monkeys suppresses kisspeptin release (Kurian et al., 2015) and that neonatal and perinatal BPA administration results in increased Kiss1 expression in the hypothalamus of male and female mouse pups (Xi et al., 2011) and female rats (Qiu et al., 2020). It is important to note that kisspeptin expression can be differentially altered by BPA depending on sex, estrus stage, age, hypothalamic kisspeptin population, and doses with the risk that high BPA doses do not reflect environmental exposure (Patisaul et al., 2009; Ruiz-Pino et al., 2019; Tang et al., 2020; Wang et al., 2014). In humans, an epidemiological study reported that placental Kiss1 mRNA levels are higher in mother-child pairs living in an electronic waste recycling town of China than in pairs from a control area, and this increased Kiss1 expression was positively associated with higher BPA concentrations in the cord blood. (Xu et al., 2015). These results suggest that kisspeptin alteration may be an early biomarker of reproductive impairment associated with BPA, even in humans. Kisspeptin expression can also be altered by other EDCs such as pesticides (Overgaard et al., 2013), PCBs and phytoestrogens (Patisaul, 2013), synthetic estrogens (Navarro et al., 2009), phthalates (Hu et al., 2013), and EDCs mixtures found in sewage sludges (Bellingham et al., 2009, 2016). There are much fewer studies reporting EDCs effect on RFRP-3 neurons. One study reported that female rats prenatally exposed to 50 µg/kg BPA exhibit a decrease in RFRP-3 expression and a reduced number of RFRP-3 fiber contacts on GnRH neurons associated with an advanced vaginal opening (Losa-Ward et al., 2012). These data suggest that prenatal exposure to BPA may advance puberty onset by decreasing the negative RFRP-3 input on GnRH neurons.

EDCs can directly disrupt GnRH neuron activity, as illustrated by the observation that low BPA concentrations inhibit intracellular calcium movement on isolated immature GnRH neurons, possibly *via* an action on voltage-gated sodium, potassium, or calcium channels (Klenke et al., 2016).

Regarding the pituitary gland, embryonic and perinatal exposures to low doses of BPA or methoxychlor increase pituitary proliferation and gonadotropic cell number in female mice (Brannick et al., 2012) and rats (Masutomi et al., 2004). This effect may result in impaired development of the pituitary with a subsequent hormonal imbalance and infertility (Brannick et al., 2012).

EDCs may also alter the neuroendocrine reproductive system through action on sex steroid receptors. For instance, chronic exposure of adult female mice with 50 μ g/kg of BPA suppresses the estrogen receptor α (ER α)-induced activation of AVPV kisspeptin neurons, leading

to prolonged diestrus and reduced ovulation (Tang et al., 2020). Besides, the embryonic and postnatal development of the GnRH neuronal network orchestrated by sex steroid hormones (Simerly, 2002) may be particularly vulnerable to the harmful actions of EDCs. Thus, mice exposed in utero to environmental doses of ethinylestradiol exhibit a higher number of GnRH neurons migrating from the vomeronasal region to the telencephalon (Pillon et al., 2012). Furthermore, EDCs may impact the sex steroid-dependent development of sexually dimorphic pathways in the hypothalamus, which may lead to impaired reproductive physiology and sexual behavior. For example, perinatal exposure to PCBs has been reported to affect the organization of the AVPV by masculinizing the hypothalamic circuits that control reproduction in female rats (Dickerson et al., 2011). Finally, EDCs may also alter the epigenetic pathways regulating the GnRH system during life, although few data are yet available to support this hypothesis (Lopez-Rodriguez et al., 2021 for review).

In conclusion, over the past three decades, studies have unraveled how EDCs may act at different levels of the HPG axis to alter reproductive function of humans and animals. Because a strict timing of reproductive physiology and behavior is crucial to optimize breeding success, it is, therefore, fundamental to assess whether EDCs impact the daily and seasonal rhythms in reproduction.

3.3. Evidence of EDCs disruption of reproductive rhythms

The potential for EDCs to alter daily and seasonal reproduction is a recent field of investigation. Yet, early indirect observations or more recent studies point towards an impact of EDCs on reproductive rhythms.

3.3.1. The circadian clock is a target of EDCs

To our knowledge, no epidemiological studies have reported EDCs effect on human reproductive cycles. However, women exposed to shift work present reproductive disorders common to those of women exposed to certain EDCs, such as irregular ovarian cycle patterns and increased risk of endometriosis (Lawson et al., 2011; Marino et al., 2008; Sirohi et al., 2021; Titus-Ernstoff et al., 2006), suggesting that light and chemical pollution could share common reproductive and/or circadian targets. In animal models, a few experimental studies have demonstrated that EDCs can disrupt central or peripheral clocks and rhythms in reproductive physiology. Thus, gestational exposure to 50 µg/kg/day BPA alters the SCN architecture of the mouse pups, with an increase in AVP neurons in the SCN core, and a decrease in neurons expressing Sox2, a transcriptional regulator of the clock gene Per2, resulting in long-lasting disrupted circadian activity for multiple generations (Nesan et al., 2021). These authors suggested that BPA binds fetal estrogen and androgen receptors located in hypothalamic progenitors to enhance their proliferation and neuronal differentiation into potential AVP neurons (Nesan et al., 2021). Considering the pivotal role of AVP neurons in the daily regulation of kisspeptin and RFRP-3 neurons, it should be investigated whether this BPA-induced alteration in ectopic development of SCN AVP neurons impairs the integration of the daily light signal which drives reproductive ovarian cycles.

Besides SCN, other hypothalamic clocks may also be disrupted by EDCs. For example, prenatal exposure of male and female rats with low doses of estradiol benzoate and Aroclor 1221, an estrogenic PCBs mixture previously used in industry, changes the expression of *Per2* and *Arntl* in the AVPV of exposed females, to a pattern similar to that of unexposed males (Walker et al., 2014). It has been hypothesized that the masculinization of the *Per2* and *Arntl* expression profile could explain the disrupted estrous cyclicity observed in treated females (Walker et al., 2014). In another study, Tischkau et al. (2011) reported that the combustion product 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin (TCDD) alters the circadian expression of *Bmal1* and *Per2* genes in the mouse ovary, potentially through an aryl hydrocarbon receptor action, but the consequences of this TCDD-induced disruption in ovarian circadian rhythms

were not explored.

Some studies conducted in zebrafish and teleost fish investigating the reproductive impact of aquatic pollutants (synthetic estrogens, progestins, and pulp and paper mill effluents) reported disrupted clock gene expressions in addition to reproductive effects (Bottalico and Weljie, 2021 for review). The underlying mechanisms responsible for the EDCs-induced clock disruption are not yet understood, but EDCs could disrupt the hormone feedback on circadian clocks by acting through hormone receptors (Bottalico and Weljie, 2021).

3.3.2. Seasonal-disrupting chemicals

3.3.2.1. Cues from wildlife. In their early studies, Leopold et al. (1976) reported that substantial levels of phytoestrogens in the vegetation eaten by wild California quails correlate with the decrease of their annual reproduction. Other studies further confirmed that phytoestrogens inhibit reproduction in wildlife (Rochester et al., 2009). From an ecological point of view, an increase in phytoestrogen concentrations during arid years could be perceived as an adaptive signal causing seasonal breeders to decrease their reproduction during times of low food quality. Such a relationship between plant signal and bird reproduction may be beneficial for population fitness. As phytoestrogens share common chemical signatures with some EDCs and bind to the same receptors, phytoestrogen-mimicking compounds could inhibit the seasonal reproduction of organisms, even though environmental conditions are favorable.

3.3.2.2. Crosstalk between seasonality and EDCs action. Early studies investigating the impact of EDCs exposure on wildlife reproduction have been carried out in seasonal breeders such as birds, fishes, sheep, and rodents but without taking into account the breeding *versus* non-breeding seasons (Hashem et al., 2018; Romanowicz et al., 2004; Yellon et al., 2000).

However, recent studies reported that exposure of zebrafish and Japanese Medaka to two aquatic estrogenic contaminants, nonvlphenol and 17_β-estradiol, alters the expression of vitellogenin1, an estrogenresponsive gene, in response to increased temperature and photoperiod (Jin et al., 2010, 2011). Another study on adult bank vole reported that exposure to 4-tert-octylphenol (OP) induces structural and functional alteration of the testis in long-day but not short-day adapted animals (Hejmej et al., 2011). Further studies indicated that OP alters the expression and distribution of testicular junction proteins in the testis of long-day but not short-day adapted animals, via an ER-mediated mechanism (Hejmej et al., 2013). Similarly, OP exhibits an LPdependent effect on motility parameters of in vitro bank vole spermatozoa (Kotula-Balak et al., 2014). Since the testes of short-day adapted bank vole express less ER_β (Bilińska et al., 2001), they could be less sensitive to the ER-mediated action of OP. Altogether these studies suggest that photoperiod can influence animals' susceptibility to EDCsinduced effect on reproductive functions in seasonal breeders.

Two studies in birds have reported that phytoestrogens may also affect reproduction during a photoperiodic transition. Thus soy isoflavones, given at 1% in the food, reduce the testicular development of Japanese quails transferred from an inhibitory SP to a stimulatory LP (Wilhelms et al., 2006). Similarly, songbirds fed with food enriched with isoflavones exhibit a one-week delay in the cloacal protuberance growth (indicating a potential decrease in circulating androgens) and higher plasma LH concentrations, although with no significant effect on testis weight at the end of the study (Corbitt et al., 2007). These subtle phytoestrogen effects on the photoperiod-driven switch in bird reproductive status suggest that EDCs may act as disruptors of seasonal cycles in reproduction, an effect which should be further investigated in other seasonal breeders. 3.3.2.3. EDCs could affect multiple hormonal systems involved in seasonal reproduction. EDCs disruptive action on photoperiod-dependent reproduction may involve several hormonal systems, notably the melatonin, thyroid hormone, and sex steroid systems. The objective here is to review EDCs effect on this photoneuroendocrine system which signals seasons to the HPG axis.

Many EDCs display sex steroids activity and interfere with normal estrogen and androgen signaling through sex steroid receptors. Because the sex steroid negative feedback plays an important role to reduce pituitary GnRH and gonadotropin secretion during anestrus in sheep, and the non-breeding period in hamsters (Legan et al., 1977; Tamarkin et al., 1976), an EDCs alteration of this seasonal sex steroid feedback is expected. However, so far, the impact of sex steroids mimicking EDCs in seasonal species has been performed independently of their photoperiodic regulation.

The duration of nocturnal melatonin secretion from the pineal gland orchestrates the synchronization of the HPG axis activity with the length of the photoperiod (Bartness et al., 1993). EDCs effects on the melatoninergic system have been investigated in fish and rodents, although not in a seasonal context. In fish, polycyclic aromatic hydrocarbons induce a strong increase in diurnal levels and a decrease in nocturnal levels of melatonin (Gesto et al., 2009). In rats, organochlorine insecticide lindane, but not DDT, increases the nocturnal synthesis of pineal melatonin (Attia et al., 1990). Similarly, parathion, a highly toxic organophosphorus insecticide now banned or restricted in many countries (Attia et al., 1991a), and carbamate-insecticides (Attia et al., 1991b) stimulate nocturnal pineal AANAT and consequently raise the nocturnal circulating level of melatonin in rats. TCDD, by contrast, decreases serum melatonin concentration in two strains of rats (Linden et al., 1991), possibly via an increased extra-hepatic metabolism of melatonin (Pohjanvirta et al., 1989, 1996). In the previous studies, the EDCs effect was tested acutely on melatonin synthesis at night, but not on the duration of the nocturnal melatonin synthesis, which provides the endocrine code for day length. To our knowledge, only the study of Yellon et al. (2000) reported that acute TCDD exposure to long-day adapted Siberian hamsters delayed their fertility but without interfering with the nighttime melatonin production and duration. Altogether, these studies reported that EDCs can target the melatoninergic system of rodents and fish. Additional experiments should evaluate the effect of EDCs on the integration of the photoperiodic/melatonin message within the reproductive pathway of seasonal breeders exposed to different photoperiodic switches.

Thyroid hormones relay the melatonin signal to the hypothalamus to synchronize seasonal reproduction (Yoshimura, 2013). Many EDCs have been reported to target the thyroid hormone system in multiple ways (Calsolaro et al., 2017). EDCs can bind to TR or alter TR-mediated transcription. For example, BPA binds with low affinity to TRa and TRβ (Wetherill et al., 2007) and can suppress TR-mediated transcription by preventing the T3 binding to TR and by recruiting a transcriptional repressor on TR (Moriyama et al., 2002; Sheng et al., 2012). EDCs can alter the expression of TSH receptors (TSH-R). For example, high doses of DEHP down-regulate TSH-R in the rat thyroid gland (Kim et al., 2021; Sun et al., 2018). Hydroxylated PCB-metabolites, which are structurally close to thyroid hormones, alter thyroid hormone binding to their serum transporters (Gutleb et al., 2016; Meerts et al., 2000). EDCs such as polybrominated diphenyl ethers and PCBs also alter deiodinase activities (Kato et al., 2004; Roberts et al., 2015; Schnitzler et al., 2011; Stapleton et al., 2009). Finally, EDCs can also disrupt iodide uptake from the bloodstream, cellular thyroid hormone transport, and sulfation or glucuronidation of thyroid hormones (Gutleb et al., 2016). Given the pivotal role of hypothalamic T3 in the seasonal synchronization of breeding activity, future experiments should investigate whether exposure to thyroid hormone-disrupting chemicals alter seasonal breeding, notably through the tanycytic interaction between TSH and TSH-R, the tanycytic expression/activity of deiodinases and thyroid hormone transporters, and the T3 signaling to downstream cellular targets such as kisspeptin and RFRP-3 neurons.

Overall, this review of the literature highlights the lack of study investigating the impact of EDCs on the seasonality of reproduction. Future studies should evaluate the effect of EDCs on the different endocrine systems (melatonin, thyroid hormones, sex steroids) during the different photoperiods that seasonal organisms experience throughout the year. Furthermore, as the photoneuroendocrine pathway is particularly sensitive to prenatal and perinatal events (Sáenz de Miera et al., 2017; van Dalum et al., 2019), and as embryonic and fetal stages are critical windows of EDCs sensitivity, the impacts of EDCs exposure during gestation and lactation on offspring's responsiveness to photoperiodic changes should also be investigated.

4. Conclusion

In a short time, human activities have modified the natural environment in which living beings cohabit, including an increased amount of light at night, a rise in global temperature, and constant chemical pollution. These rapid environmental changes have been reported to interfere with the biological timing system essential to optimize reproductive success. This review of epidemiological data in humans and studies on wild species and animal models, reports strong evidence that light pollution and EDCs exposure disrupt circadian and seasonal reproductive rhythms, and suggest some mechanisms involved in these environmental disruptive effects. The rhythmic synthesis of melatonin can be impaired by ALAN, shifted light/dark cycles, and EDCs with a negative impact on the synchronization of reproductive functions. SCN rhythmic activity is impacted by changes in light exposure, following shift work or nocturnal urban lighting, with major consequences on the endogenous HPG axis rhythms. Finally, the whole hormonal system (receptors, transporters, hormone metabolizing enzyme...) is altered by EDCs with subsequent impact on sex steroid synthesis and action, and on thyroid hormone signaling, which are essential for acute timing of reproduction. Further studies are still required to understand the complex mechanisms causing detrimental effects of light and chemical environmental disruptors on the daily and seasonal timing of reproduction, and more generally on biological rhythms. Such studies are also fundamental to provide scientific data to better assess the risk of environmental disruptors by global health and environmental safety regulatory agencies.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Figures 1, 2 and 4 were created with BioRender.com.

This work was supported by the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

References

- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., Maeda, K.-I., 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. J. Reprod. Dev. 53 (2), 367–378. https://doi.org/10.1262/ird.18146.
- Alvarez, J.D., Chen, D., Storer, E., Sehgal, A., 2003. Non-cyclic and developmental stagespecific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. Biol. Reproduct. 69 (1), 81–91. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011833.

Alvarez, J.D., Hansen, A., Ord, T., Bebas, P., Chappell, P.E., Giebultowicz, J.M., Williams, C., Moss, S., Sehgal, A., 2008. The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. J. Biol. Rhythms 23 (1), 26–36. https://doi.org/10.1177/0748730407311254.

Amir, S., Shah, S.T.A., Mamoulakis, C., Docea, A.O., Kalantzi, O.-I., Zachariou, A., Calina, D., Carvalho, F., Sofikitis, N., Makrigiannakis, A., Tsatsakis, A., 2021.

Frontiers in Neuroendocrinology 66 (2022) 100990

Endocrine disruptors acting on estrogen and androgen pathways cause reproductive disorders through multiple mechanisms: a review. Int. J. Environ. Res. Public Health 18 (4), 1464. https://doi.org/10.3390/ijerph18041464.

- Ancel, C., Bentsen, A.H., Sebert, M.E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2012. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. Endocrinology 153 (3), 1352–1363. https://doi.org/10.1210/en.2011-1622.
- Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., 2003. Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. Endocrinology 144 (7), 2892–2901. https://doi.org/10.1210/en.2003-0322.
- Anderson, G.M., Relf, H.L., Rizwan, M.Z., Evans, J.J., 2009. Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. Endocrinology 150 (4), 1834–1840. https://doi.org/10.1210/en.2008-1359.
- Angelopoulou, E., Inquimbert, P., Klosen, P., Anderson, G., Kalsbeek, A., Simonneaux, V., 2021. Daily and estral regulation of RFRP-3 neurons in the female mice. J. Circad. Rhyth. 19, 4. https://doi.org/10.5334/jcr.212.
- Angelopoulou, E., Quignon, C., Kriegsfeld, L.J., Simonneaux, V., 2019. Functional implications of RFRP-3 in the central control of daily and seasonal rhythms in reproduction. Front Endocrinol (Lausanne) 10, 183. https://doi.org/10.3389/ fendo.2019.00183.
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2010. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. J. Biol. Rhythms 25 (2), 81–91. https://doi.org/ 10.1177/0748730410361918.
- Antle, M.C., Silver, R., 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. Trend Neurosci. 28 (3), 145–151. https://doi.org/10.1016/j. tins 2005 01 003
- Attia, A.M., Mostafa, M.H., Soliman, S.A., El-Sebae, A.H., Nonaka, K.O., Withyachumnarnkul, B., Reiter, R.J., 1990. The organochlorine insecticide 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (lindane) but not 1,1,1-trichloro-2,2-bis(pchlorophenyl)ethane (DDT) augments the nocturnal increase in pineal Nacetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels. Neurochem. Res. 15 (7), 673–680.
- Attia, A.M., Reiter, R.J., Nonaka, K.O., Mostafa, M.H., Soliman, S.A., el-Sebae, A.H., 1991a. Carbaryl-induced changes in indoleamine synthesis in the pineal gland and its effects on nighttime serum melatonin concentrations. Toxicology 65 (3), 305–314. https://doi.org/10.1016/0300-483x(91)90089-j.
- Attia, A.M., Reiter, R.J., Stokkan, K.A., Mostafa, M.H., Soliman, S.A., el-Sebae, A.K., 1991b. Parathion (O, O-dimethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothioate) induces pineal melatonin synthesis at night. Brain Res. Bullet. 26 (4), 553–557. https://doi.org/ 10.1016/0361-9230(91)90095-2.
- Aubrecht, T.G., Jenkins, R., Nelson, R.J., 2015. Dim light at night increases body mass of female mice. Chronobiol. Int. 32 (4), 557–560. https://doi.org/10.3109/ 07420528.2014.986682.
- Aubrecht, T.G., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2014. Dim light at night interferes with the development of the short-day phenotype and impairs cell-mediated immunity in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol. 321 (8), 450–456. https://doi.org/10.1002/jez.1877.
- Baburski, A.Z., Andric, S.A., Kostic, T.S., 2019. Luteinizing hormone signaling is involved in synchronization of Leydig cell's clock and is crucial for rhythm robustness of testosterone productiondagger. Biol. Reproduct. 100 (5), 1406–1415. https://doi. org/10.1093/biolre/io2020.
- Bahougne, T., Kretz, M., Angelopoulou, E., Jeandidier, N., Simonneaux, V., 2020. Impact of circadian disruption on female mice reproductive function. Endocrinology 161 (4). https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa028.
- Barnes, B.M., York, A.D., 1990. Effect of winter high temperatures on reproduction and circannual rhythms in hibernating ground squirrels. J. Biol. Rhythms 5 (2), 119–130. https://doi.org/10.1177/074873049000500204.
- Barrett, P., Ebling, F.J.P., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., Archer, Z.A., Mercer, J.G., Morgan, P.J., 2007. Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. Endocrinology 148 (8), 3608–3617. https://doi.org/10.1210/en.2007-0316.
- Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., Goldman, B.D., 1993. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? J. Pineal Res. 15 (4), 161–190.
- Bebas, P., Goodall, C.P., Majewska, M., Neumann, A., Giebultowicz, J.M., Chappell, P.E., 2009. Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice. FASEB J. 23 (2), 523–533. https://doi.org/ 10.1096/fj.08-113191.
- Bedrosian, T.A., Fonken, L.K., Nelson, R.J., 2016. Endocrine Effects of circadian disruption. Ann. Rev. Physiol. 78 (1), 109–131. https://doi.org/10.1146/annurevphysiol-021115-105102.
- Bellingham, M., Fowler, P.A., Amezaga, M.R., Rhind, S.M., Cotinot, C., Mandon-Pepin, B., Sharpe, R.M., Evans, N.P., 2009. Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. Environ. Health Perspect. 117 (10), 1556–1562. https://doi.org/10.1289/ehp.0900699.
- Bellingham, M., Fowler, P.A., MacDonald, E.S., Mandon-Pepin, B., Cotinot, C., Rhind, S., Sharpe, R.M., Evans, N.P., 2016. Timing of maternal exposure and foetal sex determine the effects of low-level chemical mixture exposure on the foetal neuroendocrine system in sheep. J. Neuroendocrinol. 28 (12) https://doi.org/ 10.1111/jne.12444.

- Benoit, J., 1964. The role of the eye and of the hypothalamus in the photostimulation of gonads in the duck. Ann. New York Acad. Sci. 117, 204–216. https://doi.org/ 10.1111/j.1749-6632.1964.tb48175.x.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. Science 295 (5557), 1070–1073. https://doi.org/ 10.1126/science.1067262.
- Best, J.D., Maywood, E.S., Smith, K.L., Hastings, M.H., 1999. Rapid resetting of the mammalian circadian clock. J. Neurosci. 19 (2), 828–835. https://doi.org/10.1523/ jneurosci.19-02-00828.1999.
- Bhatti, P., Cushing-Haugen, K.L., Wicklund, K.G., Doherty, J.A., Rossing, M.A., 2013. Nightshift work and risk of ovarian cancer. Occupat. Environ. Med. 70 (4), 231–237. https://doi.org/10.1136/oemed-2012-101146.
- Bilińska, B., Schmalz-Fraczek, B., Kotula, M., Carreau, S., 2001. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. Mol. Cell. Endocrinol. 178 (1–2), 189–198. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00427-0.
- Bittman, E.L., 2016. Timing in the testis. J. Biol. Rhythms 31 (1), 12–36. https://doi.org/ 10.1177/0748730415618297.
- Bittman, E.L., Doherty, L., Huang, L., Paroskie, A., 2003. Period gene expression in mouse endocrine tissues. Am. J. Physiol.: Regulat. Integrat. Comparat. Physiol. 285 (3), R561–569. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00783.2002.
- Boden, M.J., Varcoe, T.J., Kennaway, D.J., 2013. Circadian regulation of reproduction: from gamete to offspring. Progr. Biophys. Mol. Biol. 113 (3), 387–397. https://doi. org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.01.003.
- Bódis, J., Koppán, M., Kornya, L., Tinneberg, H.R., Török, A., 2001. Influence of melatonin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells and in the superfused granulosa cell system. Gynecol. Obstetric Investigat. 52 (3), 198–202. https://doi.org/10.1159/ 000052973.
- Boissin-Agasse, L., Boissin, J., Ortavant, R., 1982. Circadian photosensitive phase and photoperiodic control of testis activity in the mink (Mustela vison Peale and Beauvois), a short-day mammal. Biol. Reproduct. 26 (1), 110–119. https://doi.org/ 10.1095/biolreprod26.1.110.
- Boivin, D.B., Boudreau, P., 2014. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. Pathol. Biologie 62 (5), 292–301. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.08.001.
- Borniger, J.C., Weil, Z.M., Zhang, N., Nelson, R.J., 2013. Dim light at night does not disrupt timing or quality of sleep in mice. Chronobiol. Int. 30 (8), 1016–1023. https://doi.org/10.3109/07420528.2013.803196.
- Bottalico, L.N., Weljie, A.M., 2021. Cross-species physiological interactions of endocrine disrupting chemicals with the circadian clock. General Comparat. Endocrinol. 301, 113650. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113650.
- Bracci, M., Manzella, N., Copertaro, A., Staffolani, S., Strafella, E., Barbaresi, M., Santarelli, L., 2014. Rotating-shift nurses after a day off: peripheral clock gene expression, urinary melatonin, and serum 17-beta-estradiol levels. Scandinavian J. Work, Environ. Health 40 (3), 295–304. https://doi.org/10.5271/sjweh.3414.
- Brainard, G.C., Richardson, B.A., Petterborg, L.J., Reiter, R.J., 1982. The effect of different light intensities on pineal melatonin content. Brain Res. 233 (1), 75–81. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90931-3.
- Brannick, K.E., Craig, Z.R., Himes, A.D., Peretz, J.R., Wang, W., Flaws, J.A., Raetzman, L. T., 2012. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth. Biol. Reproduct. 87 (4), 82. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100636.
- Bronson, F.H., 2004. Are humans seasonally photoperiodic? J. Biol. Rhythms 19 (3), 180–192. https://doi.org/10.1177/0748730404264658.
- Brown-Grant, K., Raisman, G., 1977. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 198 (1132), 279–296. https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0098.
- Brown, J.L., Li, S.H., Bhagabati, N., 1999. Long-term trend toward earlier breeding in an American bird: a response to global warming? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (10), 5565–5569. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5565.
- Cai, C., Vandermeer, B., Khurana, R., Nerenberg, K., Featherstone, R., Sebastianski, M., Davenport, M.H., 2019. The impact of occupational shift work and working hours during pregnancy on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. Am. J. Obstetr. Gynecol. 221 (6), 563–576. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.051.
- Calsolaro, V., Pasqualetti, G., Niccolai, F., Caraccio, N., Monzani, F., 2017. Thyroid disrupting chemicals. Int. J. Mol. Sci. 18 (12), 2583. https://doi.org/10.3390/ ijms18122583.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. Endocrinology 148 (11), 5258–5267. https://doi.org/10.1210/en.2007-0554.
- Cargnelutti, F., Di Nisio, A., Pallotti, F., Sabovic, I., Spaziani, M., Tarsitano, M.G., Paoli, D., Foresta, C., 2021. Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and transition age. Endocrine 72 (2), 358–374. https:// doi.org/10.1007/s12020-020-02436-9.
- Caro, S.P., Schaper, S.V., Dawson, A., Sharp, P.J., Gienapp, P., Visser, M.E., 2013. Is microevolution the only emergency exit in a warming world? Temperature influences egg laying but not its underlying mechanisms in great tits. General Comparat. Endocrinol. 190, 164–169. https://doi.org/10.1016/j. vgccn.2013.02.025.

Carson, R. (1962). Silent Spring: Houghton Mifflin.

- Carter, B.D., Diver, W.R., Hildebrand, J.S., Patel, A.V., Gapstur, S.M., 2014. Circadian disruption and fatal ovarian cancer. Am. J. Prevent. Med. 46 (3 Suppl 1), S34–41. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2013.10.032.
- Cazarez-Marquez, F., Milesi, S., Laran-Chich, M.P., Klosen, P., Kalsbeek, A., Simonneaux, V., 2019. Kisspeptin and RFRP3 modulate body mass in Phodopus

M.-A. Moralia et al.

sungorus via two different neuroendocrine pathways. J. Neuroendocrinol. 31 (4), e12710 https://doi.org/10.1111/ine.12710.

- Chassard, D., Bur, I., Poirel, V.J., Mendoza, J., Simonneaux, V., 2015. Evidence for a putative circadian kiss-clock in the hypothalamic AVPV in female mice. Endocrinology 156 (8), 2999–3011. https://doi.org/10.1210/en.2014-1769.
- Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J., Gillette, M.U., 1999. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. Proc Natl Acad Sci USA 96 (23), 13468–13473. https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13468
- Cheng, J.-C., Fang, L., Li, Y., Wang, S., Li, Y., Yan, Y., Jia, Q., Wu, Z.e., Wang, Z., Han, X., Sun, Y.-P., 2020. Melatonin stimulates aromatase expression and estradiol production in human granulosa-lutein cells: relevance for high serum estradiol levels in patients with ovarian hyperstimulation syndrome. Exp. Mol. Med. 52 (8), 1341-1350. https://doi.org/10.1038/s12276-020-00491-w.
- Cheung, P.W., McCormack, C.E., 1982. Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. Am. J. Physiol. 242 (3), R261-264. https://doi. org/10.1152/aipregu.1982.242.3.R261
- Chu, A., Zhu, L., Blum, I.D., Mai, O., Leliavski, A., Fahrenkrug, J., Oster, H., Boehm, U., Storch, K.-F., 2013. Global but not gonadotrope-specific disruption of Bmal1 abolishes the luteinizing hormone surge without affecting ovulation. Endocrinology 154 (8), 2924-2935. https://doi.org/10.1210/en.2013-1080.
- Chung, F.F., Yao, C.C., Wan, G.H., 2005. The associations between menstrual function and life style/working conditions among nurses in Taiwan. J. Occup. Health 47 (2), 149-156. https://doi.org/10.1539/joh.47.149.
- Cinzano, P., Falchi, F., 2020. Toward an atlas of the number of visible stars. J. Quantitat. Spectroscopy Radiative Transfer 253, 107059. https://doi.org/10.1016/j .2020.107059
- Cissé, Y.M., Russart, K., Nelson, R.J., Oster, H., 2020. Exposure to dim light at night prior to conception attenuates offspring innate immune responses. PLoS ONE 15 (4), e0231140. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231140.
- Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., Meijer, J.H., 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. Front. Neuroendocrinol. 37, 29-42. https://doi.org/10.1016/j. vfrne.2014.11.002
- Corbitt, C., Satre, D., Adamson, L.A., Cobbs, G.A., Bentley, G.E., 2007. Dietary phytoestrogens and photoperiodic response in a male songbird, the Dark-eyed Junco (Junco hyemalis). General Comparat. Endocrinol. 154 (1-3), 16-21. https://doi.org/ 10.1016/j.ygcen.2007.06.026.
- Daan, S., 1977. Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. Ann N Y Acad Sci, 290, 51-59. doi:10.1111/j.1749-6632.1977.tb39716.x.
- Darbre, P.D., 2019. The history of endocrine-disrupting chemicals. Curr. Opin. Endocrine Metabol. Res. 7, 26–33. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.007
- Dardente, H., 2012. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. J. Neuroendocrinol. 24 (2), 249-266. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02250.x.
- Dardente, H., Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J., 2014. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. Front Endocrinol (Lausanne) 5, 19. https://doi.org/10.3389/ fendo 2014 00019
- Davis, S., Mirick, D.K., Chen, C., Stanczyk, F.Z., 2012. Night shift work and hormone levels in women, Can, Epidemiol, Biomarkers Prev, 21 (4), 609-618, https://doi. org/10.1158/1055-9965.EPI-11-1128.
- Dawson, A., Sharp, P.J., 2007. Photorefractoriness in birds-photoperiodic and nonphotoperiodic control. General Comparat. Endocrinol. 153 (1-3), 378-384. https:// doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.043.
- de Jong, M., Caro, S.P., Gienapp, P., Spoelstra, K., Visser, M.E., 2017. Early birds by light at night: effects of light color and intensity on daily activity patterns in blue tits. J. Biol. Rhythms 32 (4), 323-333. https://doi.org/10.1177/0748730417719168.
- de Jong, M., Jeninga, L., Ouyang, J.Q., van Oers, K., Spoelstra, K., Visser, M.E., 2016. Dose-dependent responses of avian daily rhythms to artificial light at night. Physiol. Behav. 155, 172-179. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.12.012
- de Jong, M., Ouyang, J.Q., Da Silva, A., van Grunsven, R.H.A., Kempenaers, B., Visser, M. E., Spoelstra, K., 2015. Effects of nocturnal illumination on life-history decisions and fitness in two wild songbird species. Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci. 370 (1667), 20140128. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0128.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (19), 10972-10976. https:// doi.org/10.1073/pnas.1834399100.
- Deng, N., Haney, N.M., Kohn, T.P., Pastuszak, A.W., Lipshultz, L.I., 2018. The effect of shift work on urogenital disease: a systematic review. Curr. Urol. Rep. 19 (8), 57. https://doi.org/10.1007/s11934-018-0815-y.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. Ann. Rev. Physiol. 72 (1), 517-549. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821
- Dickerson, S.M., Cunningham, S.L., Patisaul, H.B., Woller, M.J., Gore, A.C., 2011. Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. Endocrinology 152 (2), 581-594. https://doi.org/10.1210/en.2010-1103.
- Dominoni, D.M., de Jong, M., Bellingham, M., O'Shaughnessy, P., van Oers, K., Robinson, J., Helm, B., 2018. Dose-response effects of light at night on the reproductive physiology of great tits (Parus major): Integrating morphological analyses with candidate gene expression. J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol. 329 (8-9), 473-487. https://doi.org/10.1002/jez.2214.
- Dominoni, D.M., Goymann, W., Helm, B., Partecke, J., 2013a. Urban-like night illumination reduces melatonin release in European blackbirds (Turdus merula): implications of city life for biological time-keeping of songbirds. Front. Zool. 10 (1), 60. https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-60.

- Dominoni, D.M., Quetting, M., Partecke, J., Wicker-Thomas, C., 2013b. Long-term effects of chronic light pollution on seasonal functions of European blackbirds (Turdus merula). PLoS ONE 8 (12), e85069. https://doi.org/10.1371/journal.po
- Dopico, X.C., Evangelou, M., Ferreira, R.C., Guo, H., Pekalski, M.L., Smyth, D.J., Cooper, N., Burren, O.S., Fulford, A.J., Hennig, B.J., Prentice, A.M., Ziegler, A.-G., Bonifacio, E., Wallace, C., Todd, J.A., 2015. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. Nat. Commun. 6 (1) https://doi.org/10.1038/ncomms8000.
- Drijfhout, W.J., van der Linde, A.G., de Vries, J.B., Grol, C.J., Westerink, B.H., 1996. Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. Neurosci. Lett. 202 (3), 185-188. https://doi. org/10.1016/0304-3940(95)12245-1.
- Ducret, E., Anderson, G.M., Herbison, A.E., 2009. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropinreleasing hormone neuron firing in the mouse. Endocrinology 150 (6), 2799-2804. oi.org/10.1210/en.2008-1623
- Dunn, P., Winkler, D.W., 1999. Climate change has affected the breeding date of tree swallows throughout North America. Proc Biol Sci 266 (1437), 2487-2490. https:// doi.org/10.1098/rspb.1999.0950.
- Durrant, J., Green, M.P., Jones, T.M., 2020. Dim artificial light at night reduces the cellular immune response of the black field cricket, Teleogryllus commodus. Insect Sci. 27 (3), 571-582. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12665.

Ebenhöh, O., Hazlerigg, D., 2013. Modelling a molecular calendar: The seasonal photoperiodic response in mammals. Chaos Solitons & Fractals 50, 39-47.

- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P., Gras, S., 2006. Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. Endocrinology 147 (8), 3769-3776. https://doi.org/10.1210/en.2006-0305.
- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C.C.M., Elvidge, C.D., Baugh, K., Portnov, B. A., Rybnikova, N.A., Furgoni, R., 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. Sci. Adv. 2 (6) https://doi.org/10.1126/sciadv.1600377.
- Fernandez, D.C., Chang, Y.T., Hattar, S., Chen, S.K., 2016a. Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (21), 6047-6052. https://doi.org/10.1073/pnas.1523629113.
- Fernandez, R., Marino, J., Varcoe, T., Davis, S., Moran, L., Rumbold, A., Brown, H., Whitrow, M., Davies, M., Moore, V., 2016b. Fixed or rotating night shift work undertaken by women: implications for fertility and miscarriage. Semin. Reprod. Med. 34 (02), 074-082. https://doi.org/10.1055/s-0036-1571354.
- Fiske, V.M., 1941. Effect of light on sexual maturation, estrous cycles, and anterior pituitary of the rat. Endocrinology 29 (2), 187-196. https://doi.org/10.1210/endo-29-2-187
- Flaws, J., Damdimopoulou, P., Patisaul, H. B., Gore, A., Raetzman, L., Vandenberg, L.N., 2020. Plastics, EDCs & Health: A Guide for Public Interest Organizations and Policymakers on Endocrine Disrupting Chemicals & Plastics. Retrieved from.
- Fonken, L.K., Workman, J.L., Walton, J.C., Weil, Z.M., Morris, J.S., Haim, A., Nelson, R. J., 2010. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (43), 18664-18669. https://doi.org/10.1073/ pnas.1008734107.
- Forister, M.L., Shapiro, A.M., 2003. Climatic trends and advancing spring flight of butterflies in lowland California. Global Change Biol. 9 (7), 1130-1135. https://doi. org/10 1046/i 1365-2486 2003 00643 x
- Frank, D.W., Evans, J.A., Gorman, M.R., 2010. Time-dependent effects of dim light at night on re-entrainment and masking of hamster activity rhythms. J. Biol. Rhythms 25 (2), 103-112, https://doi.org/10.1177/0748730409360890.
- Fry, D.M., Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. Science 213
- (4510), 922–924. https://doi.org/10.1126/science.7256288. Gamble, K.L., Resuehr, D., Johnson, C.H., 2013. Shift work and circadian dysregulation of reproduction. Front Endocrinol (Lausanne) 4, 92. https://doi.org/10.3389/ fendo 2013 00092
- Gaston, S., Menaker, M., 1967. Photoperiodic control of hamster testis. Science 158 (3803), 925-928. https://doi.org/10.1126/science.158.3803.925
- Gatford, K.L., Kennaway, D.J., Liu, H., Kleemann, D.O., Kuchel, T.R., Varcoe, T.J., 2019. Simulated shift work disrupts maternal circadian rhythms and metabolism, and increases gestation length in sheep. J. Physiol. 597 (7), 1889-1904. https://doi.org/ 10 1113/JP277186
- Gesto, M., Tintos, A., Rodríguez-Illamola, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2009. Effects of naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquatic Toxicol. 92 (1), 1-8. https://doi.org/10.1016/ aquatox.2008.12.008.
- Gibson, E.M., Humber, S.A., Jain, S., Williams, W.P., Zhao, S., Bentley, G.E., Tsutsui, K., Kriegsfeld, L.J., 2008. Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. Endocrinology 149 (10), 4958-4969. https://doi.org/10.1210/en.2008-0316
- Goldstein, C.A., O'Brien, L.M., Bergin, I.L., Saunders, T.L., 2018. The effect of repeated light-dark shifts on uterine receptivity and early gestation in mice undergoing embryo transfer. Syst. Biol. Reprod. Med. 64 (2), 103-111. https://doi.org/10.1080/ 19396368.2017.1408715
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. Physiol. Rev. 90 (3), 1063-1102. https://doi.org/10.1152/physrev.00009.200
- Gomez-Acebo, I., Dierssen-Sotos, T., Papantoniou, K., Garcia-Unzueta, M.T., Santos-Benito, M.F., Llorca, J., 2015. Association between exposure to rotating night shift versus day shift using levels of 6-sulfatoxymelatonin and cortisol and other sex hormones in women. Chronobiol. Int. 32 (1), 128-135. https://doi.org/10.3109/ 420528.2014.958494.

Gordo, O., Sanz, J.J., 2005. Phenology and climate change: a long-term study in a Mediterranean locality. Oecologia 146 (3), 484–495. https://doi.org/10.1007/ s00442-005-0240-z.

- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. Endocrine Rev. 36 (6), E1–E150. https://doi.org/ 10.1210/er.2015-1010.
- Gorman, M.R., Evans, J.A., Elliott, J.A., 2006. Potent circadian effects of dim illumination at night in hamsters. Chronobiol. Int. 23 (1–2), 245–250. https://doi. org/10.1080/07420520500521905.
- Gorman, M.R., Freeman, D.A., Zucker, I., 1997. Photoperiodism in hamsters: abrupt versus gradual changes in day length differentially entrain morning and evening circadian oscillators. J. Biol. Rhythms 12 (2), 122–135. https://doi.org/10.1177/ 074873049701200204.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145 (9), 4073–4077. https://doi.org/10.1210/en.2004-0431.
- Gras, S., Georg, B., Jorgensen, H.L., Fahrenkrug, J., 2012. Expression of the clock genes Per1 and Bmal1 during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. Cell Tissue Res. 350 (3), 539–548. https://doi. org/10.1007/s00441-012-1489-2.
- Green, A., Barak, S., Shine, L., Kahane, A., Dagan, Y., 2020. Exposure by males to light emitted from media devices at night is linked with decline of sperm quality and correlated with sleep quality measures. Chronobiol. Int. 37 (3), 414–424. https:// doi.org/10.1080/07420528.2020.1727918.
- Grindler, N.M., Allsworth, J.E., Macones, G.A., Kannan, K., Roehl, K.A., Cooper, A.R., Rosenfeld, C.S., 2015. Persistent organic pollutants and early menopause in U.S. women. PLoS ONE 10 (1), e0116057. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0116057.
- Guillette Jr., L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect. 102 (8), 680–688. https://doi.org/10.1289/ ehp.94102680.
- Guillette Jr., L.J., Woodward, A.R., Crain, D.A., Pickford, D.B., Rooney, A.A., Percival, H. F., 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. General Comparat. Endocrinol. 116 (3), 356–372. https:// doi.org/10.1006/gcen.1999.7375.
- Gutleb, A.C., Cambier, S., Serchi, T., 2016. Impact of endocrine disruptors on the thyroid hormone system. Horm Res Paediatr 86 (4), 271–278. https://doi.org/10.1159/ 000443501.
- Hannibal, J., 2006. Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. Int. Rev. Cytol. 251, 1–39. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(06)51001-0.
- Hashem, N.M., El-Azrak, K.M., Nour El-Din, A.N.M., Sallam, S.M., Taha, T.A., Salem, M. H., 2018. Effects of Trifolium alexandrinum phytoestrogens on oestrous behaviour, ovarian activity and reproductive performance of ewes during the non-breeding season. Anim. Reprod. Sci. 196, 1–8. https://doi.org/10.1016/j. anireprosci.2018.03.007.
- Hastings, M.H., Herbert, J., Martensz, N.D., Roberts, A.C., 1985. Annual reproductive rhythms in mammals: mechanisms of light synchronization. Ann. New York Acad. Sci. 453, 182–204. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb11810.x.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. Science 295 (5557), 1065–1070. https://doi.org/10.1126/science.1069609.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (8), 5476–5480. https:// doi.org/10.1073/pnas.082121499.
- Hazlerigg, D., Simonneaux, V., 2015. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, pp. 1575–1604. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00034-X.
 Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J., Johnston, J.D., 2005. Photoperiod differentially regulates
- Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J., Johnston, J.D., 2005. Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. Curr. Biol. 15 (12), R449–R4450. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.010.
- He, M., Zhou, W., Liu, K., Wang, X., Liu, C., Shi, F., Cao, J., Chen, Q., 2021. The prevalence of male rotating shift work correlates with reduced total fertility rate: an ecological study of 54,734 reproductive-aged males in 35 European countries between 2000 and 2015. Chronobiol. Int. 38 (7), 1072–1082. https://doi.org/ 10.1080/07420528.2021.1907396.
- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. Reproduct. Toxicol. 68, 3–33. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001.
- Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Chojnacka, K., Kuras, P., Lydka-Zarzycka, M., Bilinska, B., 2013. Photoperiod-dependent effects of 4-tert-octylphenol on adherens and gap junction proteins in bank vole seminiferous tubules. Int. J. Endocrinol. 2013, 1–11. https://doi.org/10.1155/2013/134589.
- Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Galas, J., Bilińska, B., 2011. Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. Reproductive Toxicol. 31 (1), 95–105. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.08.007.
- Helfer, G., Barrett, P., Morgan, P.J., 2019. A unifying hypothesis for control of body weight and reproduction in seasonally breeding mammals. J. Neuroendocrinol. 31 (3), e12680. https://doi.org/10.1111/jne.12680.
- Helle, E., Olsson, M., Jensen, S., 1976. PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. Ambio 5 (5/6), 261–262.

- Helm, B., Ben-Shlomo, R., Sheriff, M.J., Hut, R.A., Foster, R., Barnes, B.M., Dominoni, D., 2013. Annual rhythms that underlie phenology: biological time-keeping meets environmental change. Proc. Biol. Sci. 280 (1765), 20130016. https://doi.org/ 10.1098/rspb.2013.0016.
- Henningsen, J.D., Ancel, C., Mikkelsen, J.D., Gauer, F., Simonneaux, V., 2017. Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female Syrian hamsters. Endocrinol. 158 (3), 652–663. https://doi.org/10.1210/en.2016-1689.
- Henningsen, J.B., Poirel, V.J., Mikkelsen, J.D., Tsutsui, K., Simonneaux, V., Gauer, F., 2016. Sex differences in the photoperiodic regulation of RF-Amide related peptide (RFRP) and its receptor GPR147 in the Syrian hamster. J. Comparat. Neurol. 524 (9), 1825–1838. https://doi.org/10.1002/cne.23924.
- Henson, J.R., Carter, S.N., Freeman, D.A., 2013. Exogenous T(3) elicits long day-like alterations in testis size and the RFamides Kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. J. Biol. Rhythms 28 (3), 193–200. https:// doi.org/10.1177/0748730413487974.
- Herbison, A., 2015. Physiology of the adult GnRH neuronal network Knobil and Neill's physiology of reproduction, (Fourth Edition) (pp. 399–467).
- Hickok, J.R., Tischkau, S.A., 2010. In vivo circadian rhythms in gonadotropin-releasing hormone neurons. Neuroendocrinology 91 (1), 110–120. https://doi.org/10.1159/ 000243163.
- Hoffman, R.A., Reiter, R.J., 1965. Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. Science 148 (3677), 1609–1611. https://doi.org/10.1126/science.148.3677.1609.
- Hoffmann, K., 1979. Photoperiodic effects in the Djungarian hamster: one minute of light during darktime mimics influence of long photoperiods on testicular recrudescence, body weight and pelage colour. Experientia 35 (11), 1529–1530. https://doi.org/ 10.1007/BF01962828.
- Hofman, M.A., Swaab, D.F., 1993. Diurnal and seasonal rhythms of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of humans. J. Biol. Rhyth. 8 (4), 283–295. https://doi. org/10.1177/074873049300800402.
- Hu, J., Du, G., Zhang, W., Huang, H., Chen, D., Wu, D., Wang, X., 2013. Short-term neonatal/prepubertal exposure of dibutyl phthalate (DBP) advanced pubertal timing and affected hypothalamic kisspeptin/GPR54 expression differently in female rats. Toxicology 314 (1), 65–75. https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.09.007.
- Ikeno, T., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2014. Dim light at night disrupts the short-day response in Siberian hamsters. General Comparat. Endocrinol. 197, 56–64. https:// doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.12.005.
- Illnerova, H., Backström, M., Sääf, J., Wetterberg, L., Vangbo, B., 1978. Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night. Neurosci. Lett. 9 (2–3), 189–193. https://doi.org/10.1016/0304-3940(78)90070-8.
- Illnerová, H., Vaněček, J., 1985. Entrainment of the circadian rhythm in rat pineal Nacetyltransferase activity under extremely long and short photoperiods. J. Pineal Res. 2 (1), 67–78.
- Illnerová, H., Vaněcek, J., 1985. Regulation of the circadian rhythm in pineal melatonin production. Physiologia Bohemoslovaca 34 (Suppl), 57–61.
- Illnerova, H., Vaněeccek, J., Křeček, J., Wetterberg, L., Sääf, J., 1979. Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. J. Neurochem. 32 (2), 673–675. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb00407.x.
- Inouye, D.W., Barr, B., Armitage, K.B., Inouye, B.D., 2000. Climate change is affecting altitudinal migrants and hibernating species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (4), 1630–1633. https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1630.
- Jaroslawska, J., Chabowska-Kita, A., Kaczmarek, M.M., Kozak, L.P., Klingenspor, M., 2015. Npvf: hypothalamic biomarker of ambient temperature independent of nutritional status. PLoS Genetics 11 (6), e1005287. https://doi.org/10.1371/ journal.pgen.1005287.
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J., Reppert, S.M., 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. Cell 96 (1), 57–68. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80959-0
- Jin, Y., Shu, L., Huang, F., Cao, L., Sun, L., Fu, Z., 2011. Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (Oryzias latipes). Aquatic Toxicol. 101 (1), 254–260. https://doi. org/10.1016/j.aquatox.2010.10.005.
- Jin, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z., 2010. Temperature and photoperiod affect the endocrine disruption effects of ethinylestradiol, nonylphenol and their binary mixture in zebrafish (Danio rerio). Comparat. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 151 (2), 258–263. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.004.
- Jockers, R., Delagrange, P., Dubocovich, M.L., Markus, R.P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., Zlotos, D.P., 2016. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. Brit. J. Pharmacol. 173 (18), 2702–2725. https://doi.org/10.1111/bph.13536.
- Kahn, L.G., Philippat, C., Nakayama, S.F., Slama, R., Trasande, L., 2020. Endocrinedisrupting chemicals: implications for human health. Lancet Diabetes Endocrinol. 8 (8), 703–718. https://doi.org/10.1016/s2213-8587(20)30129-7.
- Kalsbeek, A., Perreau-Lenz, S., Buijs, R.M., 2006. A network of (autonomic) clock outputs. Chronobiol. Int. 23 (3), 521–535. https://doi.org/10.1080/ 07420520600651073.
- Karman, B.N., Tischkau, S.A., 2006. Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. Biol. Reproduct. 75 (4), 624–632. https://doi.org/10.1095/ biolreprod.106.050732.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. Recent Progr. Hormone Res. 40, 185–232. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571140-1.50010-4.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Robinson, J.E., Yellon, S.M., Wayne, N.L., Olster, D.H., Kaynard, A.H., 1986. Melatonin and photorefractoriness: loss of response to the melatonin signal leads to seasonal reproductive transitions in the ewe. Biol. Reproduct. 34 (2), 265–274. https://doi.org/10.1095/biolreprod34.2.265.

Kato, Y., Ikushiro, S., Haraguchi, K., Yamazaki, T., Ito, Y., Suzuki, H., Degawa, M., 2004. A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. Toxicol. Sci. 81 (2), 309–315. https://doi.org/ 10.1093/toxsci/kfh225.

- Kecklund, G., Axelsson, J., 2016. Health consequences of shift work and insufficient sleep. BMJ 355, i5210. https://doi.org/10.1136/bmj.i5210.
- Kempenaers, B., Borgstrom, P., Loes, P., Schlicht, E., Valcu, M., 2010. Artificial night lighting affects dawn song, extra-pair siring success, and lay date in songbirds. Curr. Biol. 20 (19), 1735–1739. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.028.
- Kester, M.H.A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M. W.H., Bergman, A., Safe, S.H., Kuiper, G.G.J.M., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T. J., 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. Endocrinology 141 (5), 1897–1900. https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7530.
- Kim, M.J., Kim, H.H., Song, Y.S., Kim, O.-H., Choi, K., Kim, S., Oh, B.-C., Park, Y.J., 2021. DEHP down-regulates tshr gene expression in rat thyroid tissues and FRTL-5 Rat thyrocytes: a potential mechanism of thyroid disruption. Endocrinol. Metab. (Seoul) 36 (2), 447–454. https://doi.org/10.3803/EnM.2020.920.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Maeda, K.-I., 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. Endocrinol. 146 (10), 4431–4436. https://doi.org/ 10.1210/en.2005-0195.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., Kaufer, D., 2009. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (27), 11324–11329. https://doi.org/ 10.1073/pnas.0901176106.
- Klein, D.C., Weller, J.L., 1972. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin Nacetyltransferase activity. Science 177 (4048), 532–533. https://doi.org/10.1126/ science.177.4048.532.
- Klenke, U., Constantin, S., Wray, S., 2016. BPA directly decreases GnRH neuronal activity via noncanonical pathway. Endocrinology 157 (5), 1980–1990. https://doi. org/10.1210/en.2015-1924.
- Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., Felder-Schmittbuhl, M.P., 2019. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. J. Pineal Res. 67 (1), e12575 https://doi.org/ 10.1111/jpi.12575.
- Klosen, P., Sébert, M.-E., Rasri, K., Laran-Chich, M.-P., Simonneaux, V., 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. FASEB J. 27 (7), 2677–2686. https://doi.org/10.1096/fj.13-229559.
- Konieczna, A., Rachoń, D., Owczarek, K., Kubica, P., Kowalewska, A., Kudłak, B., Wasik, A., Namieśnik, J., 2018. Serum bisphenol A concentrations correlate with serum testosterone levels in women with polycystic ovary syndrome. Reproductive Toxicol. 82, 32–37. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.09.006.
- Kotula-Balak, M., Grzmil, P., Chojnacka, K., Andryka, K., Bilinska, B., 2014. Do photoperiod and endocrine disruptor 4-tert-octylphenol effect on spermatozoa of bank vole (Clethrionomys glareolus)? General Comparat. Endocrinol. 201, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.027.
 Kovanen, L., Saarikoski, S.T., Aromaa, A., Lönnqvist, J., Partonen, T., Reitsma, P.H.,
- Kovanen, L., Saarikoski, S.T., Aromaa, A., Lönnqvist, J., Partonen, T., Reitsma, P.H., 2010. ARNTI. (BMAL1) and NPAS2 gene variants contribute to fertility and seasonality. PLoS ONE 5 (4), e10007. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0010007.
- Kriegsfeld, L.J., Jennings, K.J., Bentley, G.E., Tsutsui, K., 2018. Gonadotrophininhibitory hormone and its mammalian orthologue RFamide-related peptide-3: Discovery and functional implications for reproduction and stress.
 J. Neuroendocrinol. 30 (7), e12597 https://doi.org/10.1111/jne.12597.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., Silver, R., 2006. Identification and characterization of a gonadotropininhibitory system in the brains of mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (7), 2410–2415. https://doi.org/10.1073/pnas.0511003103.
- Kriegsfeld, L.J., Ranalli, N.J., Bober, M.A., Nelson, R.J., 2000. Photoperiod and temperature interact to affect the GnRH neuronal system of male prairie voles (Microtus ochrogaster). J. Biol. Rhythms 15 (4), 306–316. https://doi.org/10.1177/ 074873000129001413.
- Kumar, M., Sarma, D.K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., Tiwari, R., 2020. Environmental Endocrine-disrupting chemical exposure: role in noncommunicable diseases. Front. Public Health 8, 553850. https://doi.org/10.3389/ fpubh.2020.553850.
- Kurian, J.R., Keen, K.L., Kenealy, B.P., Garcia, J.P., Hedman, C.J., Terasawa, E., 2015. Acute influences of bisphenol a exposure on hypothalamic release of gonadotropinreleasing hormone and kisspeptin in female rhesus monkeys. Endocrinology 156 (7), 2563–2570. https://doi.org/10.1210/en.2014-1634.
- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sánchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Hölker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., Guanter, L., 2017. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. Sci. Adv. 3 (11) https://doi.org/ 10.1126/sciadv.1701528.
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. Nat. Rev. Endrocrinol. 16 (1), 45–57. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8.
- La Sorte, F.A., Horton, K.G., 2021. Seasonal variation in the effects of artificial light at night on the occurrence of nocturnally migrating birds in urban areas. Environ. Pollut. 270, 116085. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116085.

- Laws, M.J., Neff, A.M., Brehm, E., Warner, G.R., Flaws, J.A., 2021. Endocrine disrupting chemicals and reproductive disorders in women, men, and animal models. Adv. Pharmacol. 92, 151–190. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.03.008.
- Lawson, C.C., Whelan, E.A., Lividoti Hibert, E.N., Spiegelman, D., Schernhammer, E.S., Rich-Edwards, J.W., 2011. Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. Epidemiology 22 (3), 305–312. https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182130016.
- Lee, H.R., Jeung, E.B., Cho, M.H., Kim, T.H., Leung, P.C., Choi, K.C., 2013. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. J. Cell. Mol. Med. 17 (1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01649.x.
- Legan, S.J., Karsch, F.J., Foster, D.L., 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. Endocrinology 101 (3), 818–824. https://doi.org/10.1210/endo-101-3-818.
- Leopold, A.S., Erwin, M., Oh, J., Browning, B., 1976. Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. Science 191 (4222), 98–100. https://doi.org/ 10.1126/science.1246602.
- LeTallec, T., Théry, M., Perret, M., 2015. Effects of light pollution on seasonal estrus and daily rhythms in a nocturnal primate. J. Mammal. 96 (2), 438–445. https://doi.org/ 10.1093/jmammal/gyv047.
- Linden, J., Pohjanvirta, R., Rahko, T., Tuomisto, J., 1991. TCDD decreases rapidly and persistently serum melatonin concentration without morphologically affecting the pineal gland in TCDD-resistant Han/Wistar rats. Pharmacol. Toxicol. 69 (6), 427–432. https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1991.tb01325.x.
- Liu, K., Hou, G., Wang, X., Chen, H., Shi, F., Liu, C., Zhang, X.i., Han, F., Yang, H., Zhou, N., Ao, L., Liu, J., Cao, J., Chen, Q., 2020. Adverse effects of circadian desynchrony on the male reproductive system: an epidemiological and experimental study. Human Reproduct. 35 (7), 1515–1528. https://doi.org/10.1093/humrep/ deaa101.
- Loh, D.H., Kuljis, D.A., Azuma, L., Wu, Y., Truong, D., Wang, H.B., Colwell, C.S., 2014. Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female mice deficient in vasoactive intestinal peptide. J. Biol. Rhythms 29 (5), 355–369. https:// doi.org/10.1177/0748730414549767.
- Lomet, D., Druart, X., Hazlerigg, D., Beltramo, M., Dardente, H., 2020. Circuit-level analysis identifies target genes of sex steroids in ewe seasonal breeding. Mol. Cell. Endocrinol. 512, 110825.
- Lopez-Rodriguez, D., Franssen, D., Bakker, J., Lomniczi, A., Parent, A.S., 2021. Cellular and molecular features of EDC exposure: consequences for the GnRH network. Nat. Rev. Endrocrinol. 17 (2), 83–96. https://doi.org/10.1038/s41574-020-00436-3.
- Losa-Ward, S.M., Todd, K.L., McCaffrey, K.A., Tsutsui, K., Patisaul, H.B., 2012. Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A. Biol. Reproduction 87 (2), 28. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100826.
- Lucaccioni, L., Trevisani, V., Marrozzini, L., Bertoncelli, N., Predieri, B., Lugli, L., Berardi, A., Iughetti, L., 2020. Endocrine-disrupting chemicals and their effects during female puberty: a review of current evidence. Int. J. f Mol. Sci. 21 (6), 2078. https://doi.org/10.3390/ijms21062078.
- Lunn, R.M., Blask, D.E., Coogan, A.N., Figueiro, M.G., Gorman, M.R., Hall, J.E., Hansen, J., Nelson, R.J., Panda, S., Smolensky, M.H., Stevens, R.G., Turek, F.W., Vermeulen, R., Carreón, T., Caruso, C.C., Lawson, C.C., Thayer, K.A., Twery, M.J., Ewens, A.D., Garner, S.C., Schwingl, P.J., Boyd, W.A., 2017. Health consequences of electric lighting practices in the modern world: a report on the National Toxicology Program's workshop on shift work at night, artificial light at night, and circadian disruption. Sci. Total Environ. 607-608, 1073–1084. https://doi.org/10.1016/j. scitotenv.2017.07.056.
- Marino, J.L., Holt, V.L., Chen, C., Davis, S., 2008. Shift work, hCLOCK T3111C polymorphism, and endometriosis risk. Epidemiology 19 (3), 477–484. https://doi. org/10.1097/EDE.0b013e31816b7378.
- Marino, J.L., Holt, V.L., Chen, C., Davis, S., 2009. Lifetime occupational history and risk of endometriosis. Scandinavian J. Work Environ. Health 35 (3), 233–240. https:// doi.org/10.5271/sjweh.1317.
- Martinez-Arguelles, D.B., Culty, M., Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2009. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. Endocrinology 150 (12), 5575–5585. https://doi.org/ 10.1210/en.2009-0847.
- Masson-Pevet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N., Pevet, P., 1994. An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. Cell Tissue Res. 278 (1), 97–106. https://doi.org/10.1007/BF00305781.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.Y., Hirose, M., 2004. Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. Arch. Toxicol. 78 (4), 232–240. https://doi.org/10.1007/s00204-003-0528-x.
- McCormack, C.E., 1975. The effect of abrupt lengthening of the photoperiod on the onset of ovulation in gonadotrophin-treated immature rats. Endocrinology 96 (3), 766–772. https://doi.org/10.1210/endo-96-3-766.
- McLay, L.K., Nagarajan-Radha, V., Green, M.P., Jones, T.M., 2018. Dim artificial light at night affects mating, reproductive output, and reactive oxygen species in Drosophila melanogaster. J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol. 329 (8–9), 419–428. https://doi. org/10.1002/jez.2164.
- McPartland, J., Dantzker, H.C., Portier, C.J., 2015. Building a robust 21st century chemical testing program at the U.S. Environmental Protection Agency: recommendations for strengthening scientific engagement. Environ. Health Perspect. 123 (1), 1–5. https://doi.org/10.1289/ehp.1408601.
- Meerts, I.A., van Zanden, J.J., Luijks, E.A., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Brouwer, A., 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame

retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. Toxicol. Sci. 56 (1), 95–104. https://doi.org/10.1093/toxsci/56.1.95.

- Messager, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (5), 1761–1766. https:// doi.org/10.1073/pnas.0409330102.
- Meyer, C., Muto, V., Jaspar, M., Kussé, C., Lambot, E., Chellappa, S.L., Degueldre, C., Balteau, E., Luxen, A., Middleton, B., Archer, S.N., Collette, F., Dijk, D.-J., Phillips, C., Maquet, P., Vandewalle, G., 2016. Seasonality in human cognitive brain responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (11), 3066–3071. https://doi.org/ 10.1073/pnas.1518129113.
- Milesi, S., Simonneaux, V., Klosen, P., 2017. Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters. Scientific Reports 7 (1), 17739. https://doi.org/10.1038/ s41598-017-17920-y.
- Miller, B.H., Olson, S.L., Turek, F.W., Levine, J.E., Horton, T.H., Takahashi, J.S., 2004. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. Curr. Biol. 14 (15), 1367–1373. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.055.
- Moline, M.L., Albers, H.E., 1988. Response of circadian locomotor activity and the proestrous luteinizing hormone surge to phase shifts of the light-dark cycle in the hamster. Physiol. Behav. 43 (4), 435–440. https://doi.org/10.1016/0031-9384(88) 90116-3.
- Moline, M.L., Albers, H.E., Todd, R.B., Moore-Ede, M.C., 1981. Light-dark entrainment of proestrous LH surges and circadian locomotor activity in female hamsters. Hormones Behav. 15 (4), 451–458. https://doi.org/10.1016/0018-506x(81)90009-x.
- Morgan, P.J., Ross, A.W., Mercer, J.G., Barrett, P., 2006. What can we learn from seasonal animals about the regulation of energy balance? Progr. Brain Res. 153, 325–337. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(06)53019-5.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. J. Clin. Endocrinol. Metabolism 87 (11), 5185–5190. https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209.
- Morse, D., Cermakian, N., Brancorsini, S., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., 2003. No circadian rhythms in testis: Period1 expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. Mol. Endocrinol. 17 (1), 141–151. https:// doi.org/10.1210/me.2002-0184.
- Mrugala, M., Zlomanczuk, P., Jagota, A., Schwartz, W.J., 2000. Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. Am. J. Physiol.: Regulat. Integrat. Comparat. Physiol. 278 (4), R987–994. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.4.R987.
- Murphy, M., Jethwa, P.H., Warner, A., Barrett, P., Nilaweera, K.N., Brameld, J.M., Ebling, F.J., 2012. Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. Endocrinology 153 (1), 101–112. https://doi.org/10.1210/en.2011-1249. Nakane, Y., Ikegami, K., Ono, H., Yamamoto, N., Yoshida, S., Hirunagi, K., Ebihara, S.,
- Nakane, Y., Ikegami, K., Ono, H., Yamamoto, N., Yoshida, S., Hirunagi, K., Ebihara, S., Kubo, Y., Yoshimura, T., 2010. A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (34), 15264–15268. https://doi.org/10.1073/pnas.1006393107.
- Nakane, Y., Yoshimura, T., 2014. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. Front. Neurosci. 8, 115. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00115.
- Nakane, Y., Yoshimura, T., 2019. Photoperiodic regulation of reproduction in vertebrates. Ann. Rev. Anim. Biosci. 7 (1), 173–194. https://doi.org/10.1146/ anutrev-animal-020518-115216.
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P.J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R., Yoshimura, T., 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. Nature 452 (7185), 317–322. https://doi.org/10.1038/nature06738.
- Navara, K.J., Nelson, R.J., 2007. The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. J. Pineal Res. 43 (3), 215–224. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x.
- Navarro, V.M., Sánchez-Garrido, M.A., Castellano, J.M., Roa, J., García-Galiano, D., Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2009. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. Endocrinology 150 (5), 2359–2367. https://doi. org/10.1210/en.2008-0580.
- Nelson, R.J., Chbeir, S., 2018. Dark matters: effects of light at night on metabolism. Proc. Nutrit. Soc. 77 (3), 223–229. https://doi.org/10.1017/S0029665118000198.
- Nesan, D., Feighan, K.M., Antle, M.C., Kurrasch, D.M., 2021. Gestational low-dose BPA exposure impacts suprachiasmatic nucleus neurogenesis and circadian activity with transgenerational effects. Sci. Adv. 7 (22) https://doi.org/10.1126/sciadv.abd1159.
- Overgaard, A., Holst, K., Mandrup, K.R., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P.R., Hass, U., Mikkelsen, J.D., 2013. The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus. Neurotoxicology 37, 154–162. https://doi.org/10.1016/j. neuro.2013.04.012.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., Kay, S.A., 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal lightinduced circadian phase shifting. Science 298 (5601), 2213–2216. https://doi.org/ 10.1126/science.1076848.
- Papantoniou, K., Pozo, O.J., Espinosa, A., Marcos, J., Castaño-Vinyals, G., Basagaña, X., Juanola Pagès, E., Mirabent, J., Martín, J., Such Faro, P., Gascó Aparici, A., Middleton, B., Skene, D.J., Kogevinas, M., 2015. Increased and mistimed sex

hormone production in night shift workers. Can. Epidemiol. Biomarkers Prev. 24 (5), 854–863. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1271.

- Parks, L.G., Lambright, C.S., Orlando, E.F., Guillette Jr., L.J., Ankley, G.T., Gray Jr., L.E., 2001. Masculinization of female mosquitofish in Kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. Toxicol. Sci. 62 (2), 257–267. https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.257.
- Parmesan, C., Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. Nature 421 (6918), 37–42. https://doi.org/10.1038/ nature01286.
- Patisaul, H.B., 2013. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin system. Adv. Exp. Med. Biol. 784, 455–479. https://doi.org/ 10.1007/978-1-4614-6199-9_21.
- Patisaul, H.B., Todd, K.L., Mickens, J.A., Adewale, H.B., 2009. Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. Neurotoxicology 30 (3), 350–357. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.02.010.
- Petri, I., Diedrich, V., Wilson, D., Fernandez-Calleja, J., Herwig, A., Steinlechner, S., Barrett, P., 2016. Orchestration of gene expression across the seasons: Hypothalamic gene expression in natural photoperiod throughout the year in the Siberian hamster. Scientific Reports 6, 29689. https://doi.org/10.1038/srep29689.
- Piet, R., Fraissenon, A., Boehm, U., Herbison, A.E., 2015. Estrogen permits vasopressin signaling in preoptic kisspeptin neurons in the female mouse. J. Neurosci. 35 (17), 6881–6892. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4587-14.2015.
- Pillon, D., Cadiou, V., Angulo, L., Duittoz, A.H., 2012. Maternal exposure to 17-alphaethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. Brain Res. 1433, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.030.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blomenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2010. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 299 (1), E39–E46. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00108.2010.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. Physiol. Rev. 92 (3), 1235–1316. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010.
- Pinson, A., Bourguignon, J.P., Parent, A.S., 2016. Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. Andrology 4 (4), 706–722. https:// doi.org/10.1111/andr.12211.
- Pohjanvirta, R., Laitinen, J., Vakkuri, O., Lindén, J., Kokkola, T., Unkila, M., Tuomisto, J., 1996. Mechanism by which 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) reduces circulating melatonin levels in the rat. Toxicology 107 (2), 85–97. https://doi.org/10.1016/0300-483x(95)03241-7.
- Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., Linden, J., Laitinen, J., 1989. TCDD reduces serum melatonin levels in long-evans rats. Pharmacol. Toxicol. 65 (3), 239–240. https:// doi.org/10.1111/j.1600-0773.1989.tb01164.x.
- Poling, M.C., Quennell, J.H., Anderson, G.M., Kauffman, A.S., 2013. Kisspeptin neurones do not directly signal to RFRP-3 neurones but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. J. Neuroendocrinol. 25 (10), 876–886. https://doi.org/10.1111/jne.12084.
- Poole, E.M., Schernhammer, E.S., Tworoger, S.S., 2011. Rotating night shift work and risk of ovarian cancer. Can. Epidemiol. Biomarkers Prev. 20 (5), 934–938. https:// doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0138.
- Post, E., Forchhammer, M.C., 2008. Climate change reduces reproductive success of an Arctic herbivore through trophic mismatch. Philos. Trans. Royal Soc. London. Series B, Biol. Sci. 363 (1501), 2369–2375. https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2207.
- Provencio, I., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. Nature 415 (6871). https://doi.org/10.1038/415493a.
- Qiu, J., Sun, Y., Sun, W., Wang, Y., Fan, T., Yu, J., 2020. Neonatal exposure to bisphenol A advances pubertal development in female rats. Mol. Reproduct. Dev. 87 (4), 503–511. https://doi.org/10.1002/mrd.23329.
- Quennell, J.H., Rizwan, M.Z., Relf, H.L., Anderson, G.M., 2010. Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. J. Neuroendocrinol. 22 (4), 309–316. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01963.x.
- Quignon, C., Beymer, M., Gauthier, K., Gauer, F., Simonneaux, V., 2020. Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of Rfrp gene expression in mice. FASEB J. 34 (9), 12072–12082. https://doi.org/10.1096/ fj.202000961R.
- Radchuk, V., Reed, T., Teplitsky, C., van de Pol, M., Charmantier, A., Hassall, C., Adamík, P., Adriaensen, F., Ahola, M.P., Arcese, P., Miguel Avilés, J., Balbontin, J., Berg, K.S., Borras, A., Burthe, S., Clobert, J., Dehnhard, N., de Lope, F., Dhondt, A.A., Dingemanse, N.J., Doi, H., Eeva, T., Fickel, J., Filella, I., Fossøy, F., Goodenough, A. E., Hall, S.J.G., Hansson, B., Harris, M., Hasselquist, D., Hickler, T., Joshi, J., Kharouba, H., Martínez, J.G., Mihoub, J.-B., Mills, J.A., Molina-Morales, M., Moksnes, A., Ozgul, A., Parejo, D., Pilard, P., Poisbleau, M., Rousset, F., Rödel, M.-O., Scott, D., Senar, J.C., Stefanescu, C., Stokke, B.G., Kusano, T., Tarka, M., Tarwater, C. E., Thonicke, K., Thorley, J., Wilting, A., Tryjanowski, P., Merilä, J., Sheldon, B.C., Pape Møller, A., Matthysen, E., Janzen, F., Dobson, F.S., Visser, M.E., Beissinger, S. R., Courtiol, A., Kramer-Schadt, S., 2019. Adaptive responses of animals to climate change are most likely insufficient. Nat. Commun. 10 (1) https://doi.org/10.1038/s41467-019-10924-4.
- Rahman, M.L., Zahangir, M.M., Kitahashi, T., Shahjahan, M.d., Ando, H., 2019a. Effects of high and low temperature on expression of GnIH, GnIH receptor, GH and PRL genes in the male grass puffer during breeding season. General Comparative Endocrinol. 282, 113200. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.06.004.

Rahman, S.A., Wright Jr., K.P., Lockley, S.W., Czeisler, C.A., Gronfier, C., 2019b. Characterizing the temporal dynamics of melatonin and cortisol changes in response to nocturnal light exposure. Scientific Reports 9 (1), 19720. https://doi.org/ 10.1038/s41598-019-54806-7.

Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science 247 (4945), 975–978. https://doi.org/ 10.1126/science.2305266.

Rasri-Klosen, K., Simonneaux, V., Klosen, P., 2017. Differential response patterns of kisspeptin and RFamide-related peptide to photoperiod and sex steroid feedback in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). J. Neuroendocrinol. 29 (9), e12529. https://doi.org/10.1111/jne.12529.

Ravault, J.P., Thimonier, J., Daveau, A., Chesneau, D., Maurice, F., 1988. Melatonin patterns in ewes maintained under skeleton or resonance photoperiodic regimens. Reproduct. Nutrit. Dev. 28 (2B), 473–486. https://doi.org/10.1051/rnd:19880312.

Razavi, P., Devore, E.E., Bajaj, A., Lockley, S.W., Figueiro, M.G., Ricchiuti, V., Gauderman, W.J., Hankinson, S.E., Willett, W.C., Schernhammer, E.S., 2019. Shift work, chronotype, and melatonin rhythm in nurses. Can. Epidemiol. Biomarkers Prev. 28 (7), 1177–1186. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-1018.

Reale, D., McAdam, A.G., Boutin, S., Berteaux, D., 2003. Genetic and plastic responses of a northern mammal to climate change. Proc. Biol. Sci. 270 (1515), 591–596. https:// doi.org/10.1098/rspb.2002.2224.

Redman, J., Armstrong, S., Ng, K.T., 1983. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. Science 219 (4588), 1089–1091. https://doi.org/ 10.1126/science.6823571.

 Reiter, R.J., 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocrine Rev. 1 (2), 109–131. https://doi.org/10.1210/edrv-1-2-109.
 Reiter, R.J., 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia 49

Keiter, K.J., 1993. Ine melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia 49 (8), 654–664. https://doi.org/10.1007/bf01923947.
Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F.,

Reppert, S.M., Godson, C., Manle, C.D., Weaver, D.K., Slaugennaupt, S.A., Gusella, J.F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (19), 8734–8738. https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8734.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron 13 (5), 1177–1185. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90055-8.

Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. Curr. Biol. 16 (17), 1730–1735. https://doi.org/10.1016/ j.cub.2006.07.025.

Revel, F.G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V., Mikkelsen, J.D., 2008. RFamiderelated peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. Endocrinology 149 (3), 902–912. https://doi.org/10.1210/en.2007-0848.

Reyes-Fox, M., Steltzer, H., Trlica, M.J., McMaster, G.S., Andales, A.A., LeCain, D.R., Morgan, J.A., 2014. Elevated CO2 further lengthens growing season under warming conditions. Nature 510 (7504), 259–262. https://doi.org/10.1038/nature13207.

Riley, W., Bendall, B., Ives, M., Edmonds, N., Maxwell, D., 2012. Street lighting disrupts the diel migratory pattern of wild Atlantic salmon, Salmo salar L., smolts leaving their natal stream. Aquaculture 330–333, 74–81. https://doi.org/10.1016/J. BIOCON.2012.09.022.

Robert, K.A., Lesku, J.A., Partecke, J., Chambers, B., 2015. Artificial light at night desynchronizes strictly seasonal reproduction in a wild mammal. Proc. Biol. Sci. 282 (1816), 20151745. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1745.

Roberts, S.C., Bianco, A.C., Stapleton, H.M., 2015. Disruption of type 2 iodothyronine deiodinase activity in cultured human glial cells by polybrominated diphenyl ethers. Chem. Res. Toxicol. 28 (6), 1265–1274. https://doi.org/10.1021/acs. chemrestor 5b00072

Robertson, J.L., Clifton, D.K., de la Iglesia, H.O., Steiner, R.A., Kauffman, A.S., 2009. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. Endocrinology 150 (8), 3664–3671. https://doi.org/10.1210/en.2009-0247.

Robinet, C., Roques, A., 2010. Direct impacts of recent climate warming on insect populations. Integr. Zool. 5 (2), 132–142. https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2010.00196.x.

Rochester, J.R., Klasing, K.C., Stevenson, L., Denison, M.S., Berry, W., Millam, J.R., 2009. Dietary red clover (Trifolium pratense) induces oviduct growth and decreases ovary and testes growth in Japanese quail chicks. Reproduct. Toxicol. 27 (1), 63–71. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.11.056.

Rodprasert, W., Toppari, J., Virtanen, H.E., 2021. Endocrine disrupting chemicals and reproductive health in boys and men. Front Endocrinol (Lausanne) 12, 706532. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706532.

Rodriguez, K.M., Kohn, T.P., Kohn, J.R., Sigalos, J.T., Kirby, E.W., Pickett, S.M., Pastuszak, A.W., Lipshultz, L.I., 2020. Shift work sleep disorder and night shift work significantly impair erectile function. J. Sex. Med. 17 (9), 1687–1693. https://doi. org/10.1016/j.jsxm.2020.06.009.

Romanowicz, K., Misztal, T., Barcikowski, B., 2004. Genistein, a phytoestrogen, effectively modulates luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized ewes during seasonal anestrus. Neuroendocrinology 79 (2), 73–81. https://doi.org/ 10.1159/000076630.

Ruiz-Pino, F., Miceli, D., Franssen, D., Vazquez, M.J., Farinetti, A., Castellano, J.M., Panzica, GianCarlo, Tena-Sempere, M., 2019. Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol a disrupt postnatal Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice. Environ. Health Perspect. 127 (10), 107011.

Rumanova, V.S., Okuliarova, M., Zeman, M., 2020. Differential effects of constant light and dim light at night on the circadian control of metabolism and behavior. Int. J. Mol. Sci. 21 (15), 5478. https://doi.org/10.3390/ijms21155478. Rusak, B., Morin, L.P., 1976. Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. Biol. Reproduct. 15 (3), 366–374. https://doi.org/10.1095/biolreprod15.3.366.

Russart, K.L.G., Nelson, R.J., 2018. Artificial light at night alters behavior in laboratory and wild animals. J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol. 329 (8–9), 401–408. https:// doi.org/10.1002/jez.2173.

Russo, K.A., La, J.L., Stephens, S.B.Z., Poling, M.C., Padgaonkar, N.A., Jennings, K.J., Piekarski, D.J., Kauffman, A.S., Kriegsfeld, L.J., 2015. Circadian control of the female reproductive axis through gated responsiveness of the RFRP-3 system to VIP signaling. Endocrinology 156 (7), 2608–2618. https://doi.org/10.1210/en.2014-1762.

Sáenz de Miera, C., Bothorel, B., Jaeger, C., Simonneaux, V., Hazlerigg, D., 2017. Maternal photoperiod programs hypothalamic thyroid status via the fetal pituitary gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114 (31), 8408–8413. https://doi.org/10.1073/ pnas.1702943114.

Sáenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.P., Pévet, P., Hazlerigg, D.G., Simonneaux, V., 2014. A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. Curr. Biol. 24 (13), 1500–1506. https://doi.org/ 10.1016/j.cub.2014.05.024.

Sáenz de Miera, C., Sage-Ciocca, D., Simonneaux, V., Pévet, P., Monecke, S., 2018. Melatonin-independent photoperiodic entrainment of the circannual TSH rhythm in the pars tuberalis of the european hamster. J. Biol. Rhyth. 33 (3), 302–317. https:// doi.org/10.1177/0748730418766601.

Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. Toxicol. Sci. 94 (1), 3–21. https://doi.org/10.1093/ toxsci/kfl051.

Sati, L., 2020. Chronodisruption: effects on reproduction, transgenerational health of offspring and epigenome. Reproduction 160 (5), R79–R94. https://doi.org/10.1530/ REP-20-0298.

Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I., Colditz, G.A., 2001. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. J. Natl. Can. Inst. 93 (20), 1563–1568. https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1563.

Schnitzler, J.G., Celis, N., Klaren, P.H., Blust, R., Dirtu, A.C., Covaci, A., Das, K., 2011. Thyroid dysfunction in sea bass (Dicentrarchus labrax): underlying mechanisms and effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormone physiology and metabolism. Aquatic Toxicol. 105 (3–4), 438–447. https://doi.org/10.1016/j. aquatox.2011.07.019.

Sciarra, F., Franceschini, E., Campolo, F., Gianfrilli, D., Pallotti, F., Paoli, D., Isidori, A. M., Venneri, M.A., 2020. Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of infertility. Int. J. Mol. Sci. 21 (11), 3943. https://doi.org/10.3390/ ijms21113943.

Selonen, V., Wistbacka, R., Korpimäki, E., 2016. Food abundance and weather modify reproduction of two arboreal squirrel species. J. Mammal. 97 (5), 1376–1384. https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw096.

Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B.L., Crowley, W.F., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. New England J. Med. 349 (17), 1614–1627. https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322.

Sen, A., Hoffmann, H.M., 2020. Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. Mol. Cell. Endocrinol. 501, 110655.

Sen, A., Sellix, M.T., 2016. The circadian timing system and environmental circadian disruption: from follicles to fertility. Endocrinology 157 (9), 3366–3373. https://doi. org/10.1210/en.2016-1450.

Sheng, Z.G., Tang, Y., Liu, Y.X., Yuan, Y., Zhao, B.Q., Chao, X.J., Zhu, B.Z., 2012. Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. Toxicol. Appl. Pharmacol. 259 (1), 133–142. https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.018.

Shuboni, D., Yan, L., 2010. Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system. Neuroscience 170 (4), 1172–1178. https://doi.org/10.1016/j. neuroscience.2010.08.009.

Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A., Lehman, M.N., 1996. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. Nature 382 (6594), 810–813. https://doi.org/10.1038/382810a0.

Simerly, R.B., 2002. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. Ann. Rev. Neurosci. 25 (1), 507–536. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745.

Simonneaux, V., 2020. A Kiss to drive rhythms in reproduction. Eur. J. Neurosci. 51 (1), 509–530. https://doi.org/10.1111/ejn.14287.

Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V.J., Gauer, F., 2013. Kisspeptins and RFRP-3 act in concert to synchronize rodent reproduction with seasons. Front. Neurosci. 7, 22. https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00022.

Simonneaux, V., Bahougne, T., 2015. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. Front. Endocrinol. (Lausanne) 6, 157. https://doi.org/10.3389/ fendo.2015.00157.

Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol. Rev. 55 (2), 325–395. https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2.

Singh, D., Montoure, J., Ketterson, E.D., 2021. Exposure to artificial light at night accelerates but does not override latitude-dependent seasonal reproductive response in a North American songbird. Environ. Pollut. 279, 116867. https://doi.org/ 10.1016/j.envpol.2021.116867.

M.-A. Moralia et al.

Sirohi, D., Al Ramadhani, R., Knibbs, L.D., 2021. Environmental exposures to endocrine disrupting chemicals (EDCs) and their role in endometriosis: a systematic literature review. Rev. Environ. Health 36 (1), 101–115. https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0046.

- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology 146 (9), 3686–3692. https://doi.org/10.1210/en.2005-0488.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D. K., Steiner, R.A., 2005b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 146 (7), 2976–2984. https://doi.org/10.1210/en.2005-0323.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. J. Neurosci. 26 (25), 6687–6694. https://doi.org/10.1523/ JNEUROSCI.1618-06.2006.
- Smith, R.A., Gagné, M., Fraser, K.C., 2021. Pre-migration artificial light at night advances the spring migration timing of a trans-hemispheric migratory songbird. Environ. Pollut. 269, 116136. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116136.
- Smolensky, M., Lamberg, L., 2000. The Body Clock Guide to Better Health: How to Use your Body's Natural Clock to Fight Illness and Achieve Maximum Health. (Henry Holt & Company Inc Ed.): Henry H.and Co ed. 2000.
- Sparks, T., Carey, P.D., Combes, J., 1997. First leafing dates of trees in Surrey between 1947 and 1996. The London Naturalist, p. 76.
- Stapleton, H.M., Kelly, S.M., Pei, R., Letcher, R.J., Gunsch, C., 2009. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. Environ. Health Perspect. 117 (2), 197–202. https://doi.org/10.1289/ehp.11807.
- Stephan, F.K., Berkley, K.J., Moss, R.L., 1981. Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 6 (12), 2625–2641. https://doi.org/ 10.1016/0306-4522(81)90108-1.
- Stetson, M.H., Watson-Whitmyre, M., 1976. Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? Science 191 (4223), 197–199. https://doi.org/10.1126/ science.942799.
- Stock, D., Knight, J.A., Raboud, J., Cotterchio, M., Strohmaier, S., Willett, W., Eliassen, A.H., Rosner, B., Hankinson, S.E., Schernhammer, E., 2019. Rotating night shift work and menopausal age. Human Reproduct. 34 (3), 539–548. https://doi. org/10.1093/humrep/dey390.
- Stock, D., Schernhammer, E., 2019. Does night work affect age at which menopause occurs? Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obesity 26 (6), 306–312. https://doi.org/ 10.1097/MED.00000000000509.
- Su, S.B., Lu, C.W., Kao, Y.Y., Guo, H.R., 2008. Effects of 12-hour rotating shifts on menstrual cycles of photoelectronic workers in Taiwan. Chronobiol. Int. 25 (2), 237–248. https://doi.org/10.1080/07420520802106884.
- Summa, K.C., Vitaterna, M.H., Turek, F.W., Ebihara, S., 2012. Environmental perturbation of the circadian clock disrupts pregnancy in the mouse. PLoS ONE 7 (5), e37668. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037668.
- Sun, D.i., Zhou, L., Wang, S., Liu, T.e., Zhu, J., Jia, Y., Xu, J., Chen, H., Wang, Q.i., Xu, F., Zhang, Y., Ye, L., 2018. Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamuspituitary-thyroid axis in adolescent rat. Endocrine J. 65 (3), 261–268. https://doi. org/10.1507/endocrj.EJ17-0272.
- Takahashi, J.S., 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nat. Rev. Genet. 18 (3), 164–179. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150.
- Tamarkin, L., Hutchison, J.S., Goldman, B.D., 1976. Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. Endocrinology 99 (6), 1528–1533. https://doi.org/10.1210/endo-99-6-1528.
- Tang, C., Zhang, J., Liu, P., Zhou, Y.u., Hu, Q., Zhong, Y., Wang, X., Chen, L., 2020. Chronic exposure to low dose of bisphenol A causes follicular atresia by inhibiting kisspeptin neurons in anteroventral periventricular nucleus in female mice. Neurotoxicology 79, 164–176. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.04.011.
- Tendler, A., Bar, A., Mendelsohn-Cohen, N., Karin, O., Korem Kohanim, Y., Maimon, L., Milo, T., Raz, M., Mayo, A., Tanay, A., Alon, U., 2021. Hormone seasonality in medical records suggests circannual endocrine circuits. e2003926118 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 118 (7). https://doi.org/10.1073/pnas.2003926118.
- Thawley, C.J., Kolbe, J.J., 2020. Artificial light at night increases growth and reproductive output in Anolis lizards. Proc. Biol. Sci. 287 (1919), 20191682. https:// doi.org/10.1098/rspb.2019.1682.
- Thompson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillo, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. J. Neuroendocrinol. 16 (10), 850–858. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01240.x.
- Tischkau, S.A., Jaeger, C.D., Krager, S.L., 2011. Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol. Lett. 201 (2), 116–122. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.013.
- Titley-O'Neal, C.P., Munkittrick, K.R., Macdonald, B.A., 2011. The effects of organotin on female gastropods. J. Environ. Monit. 13 (9), 2360–2388. https://doi.org/ 10.1039/c1em10011d.
- Titus-Ernstoff, L., Troisi, R., Hatch, E.E., Wise, L.A., Palmer, J., Hyer, M., Kaufman, R., Adam, E., Strohsnitter, W., Noller, K., Herbst, A.L., Gibson-Chambers, J., Hartge, P., Hoover, R.N., 2006. Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). Int. J. Epidemiol. 35 (4), 862–868. https://doi.org/10.1093/ije/dyl106.
- Tournier, B.B., Dardente, H., Simonneaux, V., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Masson-Pévet, M., Vuillez, P., 2007. Seasonal variations of clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the European hamster (Cricetus cricetus). Eur. J. f Neurosci. 25 (5), 1529–1536. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05421.x.

- Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., Tsutsui, K., 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. Endocrinology 153 (1), 373–385. https://doi. org/10.1210/en.2011-1110.
- Ubuka, T., Son, Y.L., Tsutsui, K., 2016. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. General Comparative Endocrinol. 227, 27–50. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.009.
- Urbanski, H.F., Doan, A., Pierce, M., 1991. Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. Biol. Reproduct. 44 (4), 687–692. https://doi.org/ 10.1095/biolreprod44.4.687.
- van Dalum, J., Melum, V.J., Wood, S.H., Hazlerigg, D.G., 2019. Maternal photoperiodic programming: melatonin and seasonal synchronization before birth. Front. Endocrinol. (Lausanne) 10, 901. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00901.
- van Rosmalen, L., Hut, R.A., 2021. Food and temperature change photoperiodic responses in two vole species: different roles for hypothalamic genes. doi: 10.1101/ 2021.01.20.427447.
- van Rosmalen, L., van Dalum, J., Appenroth, D., Roodenrijs, R.T.M., de Wit, L., Hazlerigg, D.G., Hut, R.A., 2021. Mechanisms of temperature modulation in mammalian seasonal timing. FASEB J. 35 (5), e21605 https://doi.org/10.1096/ fj.202100162R.
- VanderLeest, H.T., Houben, T., Michel, S., Deboer, T., Albus, H., Vansteensel, M.J., Block, G.D., Meijer, J.H., 2007. Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. Curr. Biol. 17 (5), 468–473. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.048.
- vaněček, J., Illnerová, H., 1982. Night pineal N-acetyltransferase activity in rats exposed to white or red light pulses of various intensity and duration. Experientia 38 (11), 1318–1320. https://doi.org/10.1007/BF01954925.
- Vaněcek, J., Pavlík, A., Illnerová, H., 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. Brain Res. 435 (1–2), 359–362. https://doi.org/ 10.1016/0006-8993(87)91625-8.
- Vida, B., Deli, L., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Caraty, A., Coen, C.W., Liposits, Z., Kalló, I., 2010. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. J. Neuroendocrinol. 22 (9), 1032–1039. https://doi.org/10.1111/ j.1365-2826.2010.02045.x.
- Visser, M.E., Noordwijk, A.J.V., Tinbergen, J.M., Lessells, C.M., 1998. Warmer springs lead to mistimed reproduction in great tits (Parus major). Proc. Biol. Sci. 265 (1408), 1867–1870. https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0514.
- Viswanathan, A.N., Hankinson, S.E., Schernhammer, E.S., 2007. Night shift work and the risk of endometrial cancer. Can. Res. 67 (21), 10618–10622. https://doi.org/ 10.1158/0008-5472.CAN-07-2485.
- Walker, D.M., Goetz, B.M., Gore, A.C., 2014. Dynamic postnatal developmental and sexspecific neuroendocrine effects of prenatal polychlorinated biphenyls in rats. Mol. Endocrinol. 28 (1), 99–115. https://doi.org/10.1210/me.2013-1270.
- Walker, W.H., Meléndez-Fernández, O.H., Nelson, R.J., Reiter, R.J., 2019. Global climate change and invariable photoperiods: A mismatch that jeopardizes animal fitness. Ecol. Evolut. 9 (17), 10044–10054. https://doi.org/10.1002/ece3.5537.
- Wan, G.H., Chung, F.F., 2012. Working conditions associated with ovarian cycle in a medical center nurses: a Taiwan study. Jpn J Nurs Sci 9 (1), 112–118. https://doi. org/10.1111/j.1742-7924.2011.00191.x.
- Wang, F., Xie, N., Wu, Y., Zhang, Q., Zhu, Y., Dai, M., Zhou, J., Pan, J., Tang, M., Cheng, Q.i., Shi, B., Guo, Q., Li, X., Xie, L., Wang, B., Yang, D., Weng, Q., Guo, L., Ye, J., Pan, M., Zhang, S., Zhou, H., Zhen, C., Liu, P., Ning, K.e., Brackenridge, L., Hardiman, P.J., Qu, F., 2021a. Association between circadian rhythm disruption and polycystic ovary syndrome. Fertil. Sterility 115 (3), 771–781. https://doi.org/ 10.1016/j.fertnstert.2020.08.1425.
- Wang, J., Guan, Y., Wu, L., Guan, X., Cai, W., Huang, J., Dong, W., Zhang, B., 2021b. Changing lengths of the four seasons by global warming. Geophys. Res. Lett. 48 (6) https://doi.org/10.1029/2020GL091753.
- Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Chen, F., Zhang, J., Chen, L., 2014. Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in anteroventral periventricular nucleus of female mice. J. Endocrinol. 221 (2), 201–213. https://doi.org/10.1530/joe-13-0475.
- Wang, Y., Gu, F., Deng, M., Guo, L., Lu, C., Zhou, C., Chen, S., Xu, Y., 2016. Rotating shift work and menstrual characteristics in a cohort of Chinese nurses. BMC Womens Health 16 (1). https://doi.org/10.1186/s12905-016-0301-y.
- Wang, Z., Walker, G.W., Muir, D.C.G., Nagatani-Yoshida, K., 2020. Toward a global understanding of chemical pollution: a first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. Environ. Sci. Technol. 54 (5), 2575–2584. https:// doi.org/10.1021/acs.est.9b0637910.1021/acs.est.9b06379.s001.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reproduct. Toxicol. 24 (2), 178–198. https://doi.org/10.1016/j. reprotox.2007.05.010.
- Wilhelms, K.W., Scanes, C.G., Anderson, L.L., 2006. Lack of estrogenic or antiestrogenic actions of soy isoflavones in an avian model: the Japanese quail. Poultry Sci. 85 (11), 1885–1889. https://doi.org/10.1093/ps/85.11.1885.
- Williams 3rd, W.P., Jarjisian, S.G., Mikkelsen, J.D., Kriegsfeld, L.J., 2011. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. Endocrinology 152 (2), 595–606. https://doi.org/ 10.1210/en.2010-0943.
- Willingham, E., Crews, D., 1999. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperaturedependent sex determination. General Comparat. Endocrinol. 113 (3), 429–435. https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7221.

- Woo, M.M., Tai, C.J., Kang, S.K., Nathwani, P.S., Pang, S.F., Leung, P.C., 2001. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 86 (10), 4789–4797. https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7912.
- Woodward, A. R., Percival, H. F., Jennings, M. L., & Moore, C. T., 1993. Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. Florida Scientist, Vol. 56, No. 1 (Winter, 1993), pp. 52-63.
- Xi, W., Lee, C.K.F., Yeung, W.S.B., Giesy, J.P., Wong, M.H., Zhang, X., Hecker, M., Wong, C.K.C., 2011. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. Reproduct. Toxicol. 31 (4), 409–417. https://doi.org/10.1016/j. reprotox.2010.12.002.
- Xu, X., Chiung, Y.M., Lu, F., Qiu, S., Ji, M., Huo, X., 2015. Associations of cadmium, bisphenol A and polychlorinated biphenyl co-exposure in utero with placental gene expression and neonatal outcomes. Reproductive Toxicol. 52, 62–70. https://doi. org/10.1016/j.reprotox.2015.02.004.
- Xu, Y., Wang, Li., Cao, S., Hu, R., Liu, R., Hua, K.e., Guo, Z., Di, H.-J., Hu, Z., 2020. Genipin improves reproductive health problems caused by circadian disruption in male mice. Reprod. Biol. Endocrinol. 18 (1) https://doi.org/10.1186/s12958-020-00679-9.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R.-I., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H., 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science 288 (5466), 682–685.
- Yaw, A., McLane-Svoboda, A., Hoffmann, H., 2020. Shiftwork and light at night negatively impact molecular and endocrine timekeeping in the female reproductive axis in humans and rodents. Int. J. Mol. Sci. 22 (1), 324. https://doi.org/10.3390/ ijms22010324.
- Yellon, S.M., Singh, D., Garrett, T.M., Fagoaga, O.R., Nehlsen-Cannarella, S.L., 2000. Reproductive, neuroendocrine, and immune consequences of acute exposure to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Siberian hamster. Biol. f Reproduct. 63 (2), 538–543. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.538.

- Yip, S.H., Boehm, U., Herbison, A.E., Campbell, R.E., 2015. Conditional viral tract tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the mouse. Endocrinology 156 (7), 2582–2594. https://doi.org/10.1210/en.2015-1131.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S., 2004. PERIOD2:: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (15), 5339–5346. https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101.
- Yoshimura, T., 2013. Thyroid hormone and seasonal regulation of reproduction. Front. Neuroendocrinol. 34 (3), 157–166. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.04.002.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. Nature 426 (6963), 178–181. https://doi. org/10.1038/nature02117.
- Yoshinaka, K., Yamaguchi, A.i., Matsumura, R., Node, K., Tokuda, I., Akashi, M., 2017. Effect of different light-dark schedules on estrous cycle in mice, and implications for mitigating the adverse impact of night work. Genes to Cells 22 (10), 876–884. https://doi.org/10.1111/gtc.12522.
- Zhang, S., Chen, X., Zhang, J., Li, H., 2014. Differences in the reproductive hormone rhythm of tree sparrows (Passer montanus) from urban and rural sites in Beijing: the effect of anthropogenic light sources. General Comparat. Endocrinol. 206, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.05.020.
- Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. Endocrinology 153 (9), 4097–4110. https://doi.org/10.1210/en.2012-1422.

U	niversité			
	de Strasbo	0	urg	

Marie-Azélie MORALIA

Éc	ole	doctorale				
Sc	ien	ces de la vi	e			
et de la santé ED 414						
Université de Strasbourg						

Évaluation des impacts neuroendocriniens de l'exposition au Bisphénol A au cours du cycle biologique d'un rongeur saisonnier (*Phodopus sungorus*)

Résumé

La majorité des espèces adaptent leur reproduction et leur métabolisme énergétique aux rythmes des saisons de façon à assurer la naissance des petits au printemps quand les ressources sont favorables à la survie et à la croissance des individus. L'exposition à des contaminants chimiques environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens peut induire des effets délétères sur la reproduction et le métabolisme énergétique de nombreuses espèces. Ce travail contribue à évaluer l'effet d'une exposition au Bisphénol A (BPA) sur l'adaptation physiologique des hamsters aux saisons. L'exposition au BPA à l'âge adulte altère la dynamique des adaptations reproductives et métaboliques des hamsters aux changements de durée de jours (photopériode) avec des différences selon le sexe et la dose d'exposition. De plus, l'exposition au BPA pendant la période périnatale perturbe la fertilité des mères et leur comportement de soins maternels, ce qui modifie la croissance des petits et leur réponse physiologique aux saisons.

Mots-clés : rythmes saisonniers – perturbateurs endocriniens – bisphénol A - neuroendocrinologie – photopériode

Résumé en anglais

Most species adapt their reproduction and energy metabolism to the rhythms of the seasons to ensure the birth of offspring in spring when resources are optimal for survival and growth. Exposure to environmental chemical contaminants such as endocrine disruptors can induce deleterious effects on reproduction and energy metabolism of many species. This work contributes to assess the effect of Bisphenol A (BPA) exposure on the seasonal adaptation of hamsters. Hamsters' exposure to BPA during adulthood alters the dynamics of reproductive and metabolic adaptations following day length variations (photoperiod) with differences depending on the sex and the dose exposure. Furthermore, in early life, BPA exposure disrupts the fertility and nursing behaviour of the mothers, which alters pups' growth and their physiological response to seasons.

Keywords: seasonal rhythms – endocrine disrupting chemicals – bisphenol A – neuroendocrinology - photoperiod